



Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht-invasiver ^{19}F -MR-Bildgebung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pascal Bouvain

aus Herten

Düsseldorf, September 2018

aus dem Institut für Molekulare Kardiologie,

in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Kardiovaskuläre Bildgebung,

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Flögel

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

„Ex nihilo nihil fit“ – Melissos von Samos

1. Abkürzungsverzeichnis	VIII
2. Abbildungsverzeichnis	XII
3. Einleitung	15
3.1 Die Entzündungsantwort nach einem akuten Myokardinfarkt	15
3.1.1 Die inflammatorische Phase	16
3.1.2 Reparatur, Proliferation und Maturation	19
3.2 Magnetresonanstechniken	21
3.2.1 Einige physikalische Grundlagen	21
3.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)	22
3.2.2.1 Kontrastmittel für die MRT	22
3.3 ¹⁹ F-Magnetresonanz-Bildgebung	23
3.3.1 Perfluorkarbone	23
3.3.2 Perfluorkarbon-Nanoemulsionen	25
3.3.2.1 Nanoemulsionen	25
3.3.2.2 Herstellung von Nanoemulsionen	26
3.3.2.3 Charakterisierung & Stabilität von Nanoemulsionen	28
3.3.3 Bildgebung von Entzündungsprozessen mittels PFCs und ¹⁹ F-MRT	29
3.3.4 Oberflächenmodifikation von PFCs und aktives Targeting	30
3.3.4.1 PEGylierung von PFCs	30
3.3.4.2 Aktives Targeting von Zellen	32
4. Zielsetzung	33
5. Materialien	34
5.1 Geräte	34
5.2 Chemikalien & Reagenzien	36
5.3 Verbrauchsmaterialien	37
5.4 Antikörper	38
5.5 Puffer	39
5.6 Verwendete Zelllinien	40

5.7 Verwendete Peptide	40
6. Methoden	42
6.1 Herstellung, Modifizierung und Charakterisierung von Nanoemulsionen	42
6.1.1 Herstellung verschiedener PFCs	42
6.1.2 Modifikation von Nanoemulsionen	43
6.1.2.1 PEGylierung von Nanoemulsionen mittels SPIT	43
6.1.2.2 Integration von GFP in PFCs mittels SPIT	43
6.1.2.3 Kopplung von GFP an ^{Mal} PFCs	44
6.1.2.4 Kopplung von Peptiden an ^{Mal} PFCs	44
6.1.3 Charakterisierung von Nanoemulsionen	45
6.1.3.1 Charakterisierung von Nanoemulsionen mittels PCS	45
6.1.3.2 Fluoreszenz- und ¹⁹ F-Messungen von Nanoemulsionen	46
6.1.3.3 Einfluss von freien Radikalen auf das Fluoreszenzsignal	46
6.1.3.4 Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
6.2 Experimente mit kultivierten Zelllinien	47
6.2.1 Zelluläre Aufnahme von PFCs	47
6.2.1.1 Durchflusszytometrie	47
6.2.1.2 ¹⁹ F-Messungen	47
6.2.2 Titrationsreihe verschiedener PEGylierungsmengen mittels SPIT	48
6.2.3 Transfektion von CHO-Zellen	49
6.2.3.1 Transiente Transfektion von CHO-Zellen	49
6.2.3.2 Herstellung von stabilen CIR1-3 transfizierten CHO-Zellen	49
6.2.4 Expression der Cargo-Internalisationsrezeptoren CIR1-3	49
6.2.4.1 Durchflusszytometrie	49
6.2.4.2 Western Blot	50
6.2.5 Zellassays mit den CIR1-3	50
6.2.5.1 Aufnahmekinetik von GFP in CIR1-3	50
6.2.5.2 Aufnahmekinetik von ^{GFP} PFCs in CIR1-3	51

6.2.5.3	Inhibition der ^{GFP} PFC-Aufnahme durch Präinkubation mit GFP	51
6.2.5.4	Aufnahme von ^{GFP} PFCs mittels ¹⁹ F-Messungen	51
6.2.5.5	Ko-Kultur zur Ermittlung der Spezifität der ^{GFP} PFCs	52
6.2.6	Immunzytochemische Färbungen der CIR1-3	53
6.3	Versuche mit primär isolierten Immunzellen	53
6.3.1	Aufnahmekinetik von Nanoemulsionen durch murine Immunzellen	54
6.3.2	Peptid Assays	55
6.3.2.1	Funktionalitätstest von Peptiden auf Immunzellen verschiedener Spezies	55
6.3.2.2	Bindungskapazität von NG2 an Granulozyten von Gesunden und nach MI	56
6.3.2.3	Peptidbindung nach Aktivierung durch LPS	56
6.3.2.4	Internalisierungsnachweis von NG2 mittels Kopplung an pH-Rodo	56
6.3.2.5	Identifikation des Bindepartners von NG2	57
6.3.3	^{NG2} PFCs Assays	57
6.3.3.1	Aufnahmekinetik von ^{NG2} PFCs durch humane Immunzellen	57
6.3.3.2	Inhibition der Aufnahme durch NG2-Präinkubation	58
6.3.3.3	Aufnahmenachweis von ^{NG2} PFCs mittels ¹⁹ F Messungen	58
6.3.3.4	ROS-Assay nach Inkubation mit ^{NG2} PFCs	59
6.3.3.5	Messung von Aktivitätsmarkern nach ^{NG2} PFC-Inkubation	59
6.3.3.6	Fluoreszenzmikroskopische Analysen	59
6.3.4	Vergleich der Endozytose von gesunden und Infarktpatienten	59
6.3.4.1	Endozytosemessung mittels Dextranpartikel	60
6.3.4.2	Endozytosemessung mittels PFCs	60
6.3.5	Migrationsuntersuchungen	60
6.3.5.1	Migrationsassay von humanen Granulozyten	60
6.3.5.2	Einfluss von ^{NG2} PFCs auf die Migration von neutrophilen Granulozyten	61
6.3.5.3	CXCR1 und CXCR2 Expression auf neutrophilen Granulozyten	61
6.3.5.4	ELISA von ERK1/ERK2	61
6.4	Tierversuche in der Maus	62

6.4.1 Auswaschkinetik von Nanoemulsionen über 24 Stunden aus Blut, Leber und Milz	62
6.4.2 Matrigel als mildes Inflammationsmodell	62
6.4.2.1 Akkumulierung von Nanoemulsionen im Matrigel	62
6.4.2.2 Durchflusszytometrische Messungen der isolierten Zellen aus dem Matrigel	63
6.4.2.3 Isolation der Zellen aus dem Matrigel und anschließende <i>ex vivo</i> Inkubation	63
6.4.2.4 <i>In vivo</i> Detektion von BaF-CIR-Zellen innerhalb eines Matrigel	63
6.4.3 Aufnahme von PFCs unterschiedlicher Größe durch murine Immunzellen <i>in vivo</i>	64
6.5 Statistische Auswertung	64
7. Ergebnisse	65
7.1 Einfluss von Größe und Oberflächenbeschaffenheit auf die zelluläre Aufnahme von PFCs	65
7.1.1 PEGylierung der PFC-Oberfläche	65
7.1.1.1 Charakterisierung von PFCs und ^{PEG} PFCs	66
7.1.1.2 Der Effekt einer PFC-PEGylierung auf deren Aufnahme durch kultivierte Zelllinien	68
7.1.1.3 Der Effekt einer PFC-PEGylierung auf <i>ex vivo</i> isolierte murine Immunzellen	71
7.1.1.4 Abnahme des Fluoreszenzsignals von PFCs nach Internalisierung	74
7.1.2 Modulation der Partikelgröße	76
7.1.2.1 Charakterisierung von PFCs und ^{PEG} PFCs unterschiedlicher Größe	76
7.1.2.2 Einfluss von Durchmesser und PEGylierung auf die zelluläre PFC-Aufnahme <i>in vitro</i>	78
7.1.2.3 Untersuchung der PFC-Aufnahme durch humane Immunzellen <i>ex vivo</i>	81
7.1.2.4 Auswirkung der PFC-Modifikation auf Inflammationsbildung und Gewebeverteilung <i>in vivo</i>	83
7.2 Markierung bestimmter Zellpopulationen über das aktive Targeting von PFCs	87
7.2.1 Aktives Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten	87
7.2.1.1 Bindung von NG2 an neutrophile Granulozyten	88
7.2.1.1.1 Bindungsnachweis von NG2 an humane Granulozyten nach Myokardinfarkt	89
7.2.1.1.2 Internalisierungsnachweis von NG2 in humane Granulozyten nach STEMI	90

7.2.1.2	Identifizierung des Bindepartners von NG2	91
7.2.1.3	Herstellung und Charakterisierung von ^{NG2} PFCs	94
7.2.1.4	Aufnahme der ^{NG2} PFCs in humane neutrophile Granulozyten	95
7.2.1.4.1	Nachweis der Aufnahme von ^{NG2} PFCs mittels Durchflusszytometrie	95
7.2.1.4.2	Endozytoseeigenschaften von Granulozyten gesunder Probanden und STEMI-Patienten	98
7.2.1.4.3	Inhibition der Aufnahme durch Vorinkubation mit NG2	99
7.2.1.4.4	Mikroskopische Aufnahmen von Granulozyten nach ^{NG2} PFC- oder ^{NGC} PFC-Inkubation	100
7.2.1.4.5	Nachweis der ^{NG2} PFC-Aufnahme mittels ¹⁹ F-MRT	101
7.2.1.5	Einfluss von NG2 auf Vitalität und Aktivität humaner Granulozyten	103
7.2.1.6	Einfluss des STEMI auf die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	105
7.2.1.6.1	Migrationsassay	105
7.2.1.6.2	Expression von CXCR1/2	106
7.2.2	Aufbau und Etablierung eines Cargo-Internalisierungs-Rezeptor-Systems (CIR)	108
7.2.2.1	Expression der CIRs	110
7.2.2.2	Herstellung und Charakterisierung von ^{GFP} PFCs	112
7.2.2.3	Bindung und Internalisierung von ^{GFP} PFCs	114
7.2.2.3.1	¹⁹ F-MRT-Messungen	115
7.2.2.3.2	Durchflusszytometrische Messungen	118
7.2.2.3.3	Immunzytochemie	119
7.2.2.4	Kompetitionsexperimente	120
7.2.2.5	Aufnahme von ^{GFP} PFCs in einer Ko-Kultur von CIR ⁺ -Zellen und murinen Immunzellen	121
7.2.2.6	<i>In vivo</i> Detektion von CIR ⁺ -Zellen innerhalb eines Matrigel/LPS- Inflammationsmodells	122
8.	Diskussion	124
8.1	Einfluss von Größe und Oberflächenbeschaffenheit auf die zelluläre Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen	125

8.1.1 PEGylierung der PFC-Oberfläche reduziert die zelluläre Assoziation _____	125
8.1.2 Einfluss der Partikelgröße auf die zelluläre Aufnahme von PFCs _____	129
8.2 Detektion spezifischer Zellpopulationen über das aktive Targeting von PFCs _____	133
8.2.1 Aktives Targeting von humanen Granulozyten _____	134
8.2.2 Aufbau und Etablierung eines Cargo <i>Internalization</i> Rezeptor (CIR) Systems _____	138
8.3 Ausblick _____	141
9. Zusammenfassung _____	142
10. Abstract _____	143
11. Literaturverzeichnis _____	144
12. Danksagung _____	164
13. Erklärung _____	166
14. Publikationsliste _____	167
14.1 Veröffentlichungen _____	167
14.2 Kongressbeiträge _____	167

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	arbitrary units
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CHO	chinese hamster ovary
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CXCR1	CXC-chemokine motif 1
CXCR2	CXC-chemokine motif 2
DAMPs	danger associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPR	enhanced permeability and retention
et al.	et alteri

Abkürzungsverzeichnis

EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	fluorescent activated cell scanning/sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	forward scatter
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GFP	green fluorescent protein
GPCR	g-protein coupled receptor
Gro- α (CXCL1)	chemokine (C-X-C) motif 1
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	4-12-Hydroxyethyl-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IL-	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
I/R	Ischämie/Reperfusion
i. v.	intravenös
Kryo-TEM	Kryo-Transemmissionsmikroskopie
L	Liter
M	Molarität
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC I	major histocompatibility complex I
MHC II	major histocompatibility complex II

Abkürzungsverzeichnis

min		Minute
ml		Milliliter
µl		Mikroliter
mM		Millimolar
mm		Millimeter
µm		Mikrometer
MRT		Magnetresonanztomographie
ms		Millisekunde
mV		Millivolt
Na ⁺		Natrium
NaCl		Natriumchlorid
NE		Nanoemulsion
NETs		nuclear extracellular traps
NF-κB		nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm		Nanometer
NMR		nuclear magnetic resonance
o/w		Öl in Wasser
PBS		phosphat buffered saline
PCS		Photonen Korrelationsspektroskopie
PEG		Polyethylenglykol
PET		Positronen Emissionstomographie
PFA		Paraformaldehyd
PFCE		Perfluorkronether
PFOB		Perfluoroktylbromid
PFCs		Perfluorkarbon-Nanoemulsion
pH		negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PRR		pattern recognition receptor
PSGL-1		P-Selektin Glykoprotein 1
ROS		reactive oxygen species

s. c.	_____	subcutan
sec.	_____	Sekunde
SPECT	_____	Single-Photon Emissions Computertomographie
SPIO	_____	super paramagnetic iron oxide particles
STAT3	_____	signal transducer and activator of transcription 3
STEMI	_____	ST-elevated myocardial infarction
Tab.	_____	Tabelle
TGF- β	_____	transforming growth factor β
TLR	_____	toll-like receptor
TNF- α	_____	Tumor Nekrose Faktor α
V	_____	Volt
w/o	_____	Wasser in Öl

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Übersicht über das Herz und die Pathophysiologie des Myokardinfarkts.	16
Abbildung 3.2: Leukodiapedese.....	18
Abbildung 3.3: Übersicht über verschiedene Perfluorkarbonate.	25
Abbildung 3.4: Überblick über den Herstellungsprozess von Nanoemulsionen.....	27
Abbildung 3.5: Koaleszenz und Ostwald Reifung.	28
Abbildung 3.6: ^{19}F -Inflammationsbildgebung.	30
Abbildung 3.7: Einfluss der PEG-Mengen auf den Abschirmungseffekt.	31
Abbildung 6.1: Schema der Durchflusszytometrie für die Mausversuche.....	55
Abbildung 7.1: Charakterisierung der PFCs und $^{\text{PEG}}$ PFCs.....	66
Abbildung 7.2: Kryo-TEM Aufnahmen von $^{\text{Rho}}$ PFCs und $^{\text{Rho/PEG}}$ PFCs.....	67
Abbildung 7.3: Zelluläre Aufnahmekinetik der $^{\text{Cfl}}$ PFCs und $^{\text{Cfl/PEG}}$ PFCs.....	69
Abbildung 7.4: Zelluläre Aufnahmekinetik von $^{\text{Rho}}$ PFCs und $^{\text{Rho/PEG}}$ PFCs.	71
Abbildung 7.5: Zelluläre Aufnahme von $^{\text{Cfl}}$ PFCs und $^{\text{Cfl/PEG}}$ PFCs von murinen Immunzellen in Vollblut.	72
Abbildung 7.6: Zelluläre Aufnahme von $^{\text{Cfl}}$ PFCs und $^{\text{Cfl/PEG}}$ PFCs von murinen Immunzellen in MACS-Puffer.	74
Abbildung 7.7: Einfluss von H_2O_2 auf das Fluoreszenzsignal von PFCs.	75
Abbildung 7.8: Charakterisierung der PFCs unterschiedlicher Durchmesser.....	77
Abbildung 7.9: Zelluläre Aufnahme von Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser <i>in vitro</i>	78
Abbildung 7.10: Zelluläre Aufnahme von PEGylierten Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser <i>in vitro</i>	79

Abbildung 7.11: Titrationsreihe der PEGylierung von Emulsionen unterschiedlichen Durchmessers.	80
Abbildung 7.12: Zelluläre Aufnahme von PFCs und ^{PEG} PFCs unterschiedlichen Durchmessers <i>in vitro</i>	81
Abbildung 7.13: Zelluläre Aufnahme von PEGylierten Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser <i>ex vivo</i>	82
Abbildung 7.14: <i>In vivo</i> Aufnahme von PFCs mit unterschiedlichem Durchmesser.	84
Abbildung 7.15: <i>In vivo</i> und <i>ex vivo</i> Aufnahme von PFCs durch Immunzellen im Matrigel/LPS-Modell.	86
Abbildung 7.16: Übersicht über die verwendeten Peptide.	88
Abbildung 7.17: Spezifitätstest der Peptide für humane Granulozyten.	89
Abbildung 7.18: Bindung der Peptide an neutrophile Granulozyten von gesunden und STEMI Patienten.	90
Abbildung 7.19: Internalisierungsnachweis mittels pH-Rodo Färbung.	91
Abbildung 7.20: Identifikation des NG2-Bindepartners auf humanen neutrophilen Granulozyten.	93
Abbildung 7.21: Charakterisierung der ^{NG2} PFCs und ^{NGC} PFCs.	94
Abbildung 7.22: Kryo-TEM-Aufnahmen der ^{NGC} PFCs und ^{NG2} PFCs.	95
Abbildung 7.23: Aufnahme von ^{NG2} PFCs in humane neutrophile Granulozyten.	96
Abbildung 7.24: Vergleich von gesunden und STEMI-Blutproben bezüglich der Aufnahme von ^{NG2} PFCs.	98
Abbildung 7.25: Kein Unterschied in der Endozytose zwischen Gesunden und STEMI.	99
Abbildung 7.26: Hemmung der ^{NG2} PFC-Aufnahme durch Vorinkubation mit NG2.	100
Abbildung 7.27: Mikroskopische Aufnahmen von Granulozyten nach Internalisation von ^{NG2} PFCs und ^{NGC} PFCs.	101
Abbildung 7.28: ¹⁹ F-Bildgebung von neutrophilen Granulozyten.	102

Abbildung 7.29: NG2 PFCs induzieren keine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.	104
Abbildung 7.30: Einfluss der PFC-Beladung auf die Migration von Granulozyten bei unterschiedlicher Zelldichte.	105
Abbildung 7.31: Migration von neutrophilen Granulozyten.	106
Abbildung 7.32: Untersuchung der migrationsabhängigen Rezeptorexpression sowie Signalkaskade.	107
Abbildung 7.33: Aufbau der verschiedenen Cargo Internalization Rezeptoren.	108
Abbildung 7.34: Schematische Übersicht der Funktion der CIRs.	109
Abbildung 7.35: Bindung von GFP an transient transfizierte CHO-Zellen.	110
Abbildung 7.36: Nachweis der stabilen Transfektion von CIR1-3 in CHO-Zellen.	111
Abbildung 7.37: Charakterisierung der GFP PFCs.	113
Abbildung 7.38: Kryo-TEM Aufnahmen der GFP PFCs.	114
Abbildung 7.39: Darstellung der transient transfizierten Zellen mittels ^{19}F -MRT und IVIS.	115
Abbildung 7.40: Visualisierung von CIR-exprimierenden CHO-Zellen mittels ^{19}F -Bildgebung:	117
Abbildung 7.41: Aufnahmekinetik von GFP PFCs in stabile CHO-CIR1–3-Zellen.	118
Abbildung 7.42: Immunzytochemische Färbungen der transient transfizierten COS-7 Zellen.	119
Abbildung 7.43: Immunzytochemische Färbungen der stabil transfizierten CHO-CIR1 – 3 Zellen. ...	120
Abbildung 7.44: Präinkubation der CHO-CIR1-3-Zellen mit GFP.	121
Abbildung 7.45: Ko-Kultur von CIR und murinen Immunzellen.	122
Abbildung 7.46: <i>In vivo</i> Detektion von CIR-exprimierenden BaF3-Zellen.	123
Abbildung 8.1: Überblick über die unterschiedlichen Endozytosewege in die Zelle.	129
Abbildung 8.2: Hypothetische Funktion der CIR.	138
Abbildung 8.3: Strategie für ein zellspezifisches Targeting <i>in vivo</i>	141

3. Einleitung

3.1 Die Entzündungsantwort nach einem akuten Myokardinfarkt

Das kardiovaskuläre System wird anatomisch durch das Herz sowie die einzelnen Gefäße im Organismus dargestellt. Dabei übernimmt es eine Vielzahl an Aufgaben – eine der wichtigsten ist dabei der Transport von Sauerstoff sowie der Abtransport von Kohlenstoffdioxid. Es erfüllt aber auch wichtige Funktionen für den Transport von Nährstoffen, die Wärmeregulation, sowie immunregulatorische Funktionen. Im Zentrum des kardiovaskulären Systems steht das Herz.

Das Herz ist eine in vier Kammern gegliederte Pumpe, welche in eine rechte und eine linke Hälfte unterteilt wird. Von der *Vena Cava* kommend gelangt sauerstoffarmes Blut in den rechten Vorhof und wird durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel gepumpt. Von dort strömt es durch die Pulmonalklappe die Pulmonalarterie entlang bis in die Lunge und wird dort mit Sauerstoff angereichert. Anschließend gelangt es über die Pulmonalvene in den linken Vorhof und von dort durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Durch die Aortenklappe wird das Blut in die Aorta gepumpt und erreicht so die peripheren Blutgefäße.

Auf zellulärer Ebene besteht das Herz aus Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und einigen Immunzelltypen. Den Großteil der Zellmasse machen dabei die Kardiomyozyten aus, den größten prozentualen Anteil jedoch die Endothelzellen.

Die Versorgung des Herzens wird über die Koronararterien geregelt. Diese entspringen oberhalb der Aortenklappen und verlaufen über die rechte und linke Koronararterie bis zur Herzspitze, wobei sie über die gesamte Strecke hinweg immer weiter verästeln und so die Versorgung des Herzens gewährleisten.¹ Eine Verengung oder gar ein Verschluss der Koronararterien führt zur Unterversorgung der nachgeschalteten Bereiche mit Sauerstoff, man spricht von einer Ischämie (Abb. 3.1). Hält dieser Zustand länger an, sterben die Kardiomyozyten ab und ein Herzinfarkt ist die Folge.² Der Fortschritt in der Medizin vermindert zwar die akute Mortalität nach einem Myokardinfarkt, allerdings sind die damit einhergehenden Folgeerscheinungen immer noch sehr problematisch.³⁻⁶ Selbige werden in großem Maß durch die akute Phase des Myokardinfarkts geprägt, welche im Folgendem im Detail beschrieben wird.^{7,8} Die Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt wird in drei unterschiedliche Phasen unterteilt: Die inflammatorische Phase, die reparative und proliferative Phase und die Maturation.

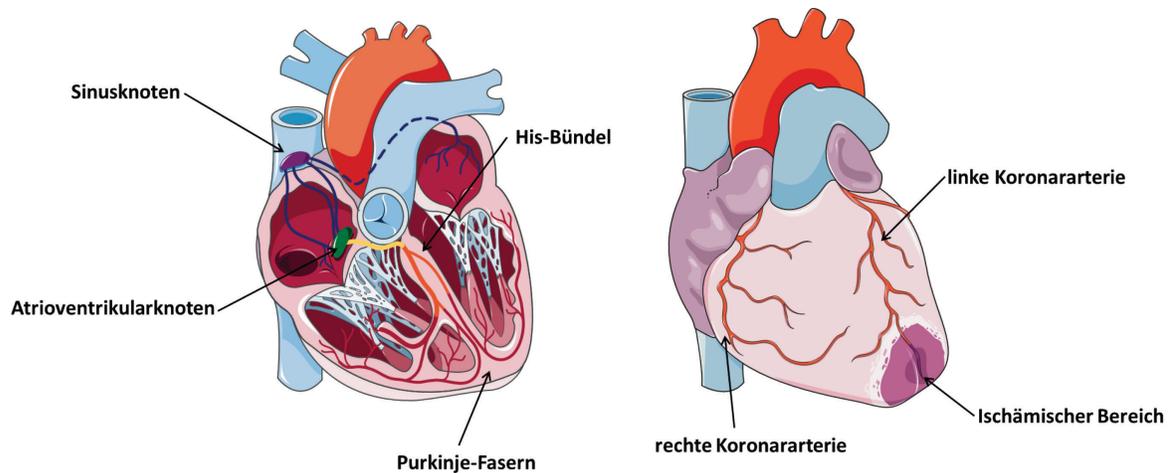


Abbildung 3.1: Übersicht über das Herz und die Pathophysiologie des Myokardinfarkts.

Links: Querschnitt eines menschlichen Herzens. Deutlich erkennbar ist die Gliederung des gesamten Systems in vier Kammern, zwei Vorhöfe und zwei Atrien. Für die autonome Funktion des Herzens sind verschiedene Schrittmacherzentren im Herzen verantwortlich. Die Erregung geht primär vom Sinusknoten aus und breitet sich dann über den gesamten Herzmuskel bis in die Herzspitze aus. **Rechts:** Pathophysiologie des Herzens nach einem Verschluss der Koronararterie. Ist die Durchblutung des Myokards durch eine Verengung verringert oder sogar komplett unterbunden, tritt sehr schnell Sauerstoffmangel ein, so dass ein ischämischer Bereich - hier angedeutet in der Herzspitze - entsteht. Sollte die Sauerstoffzufuhr nicht wieder hergestellt werden, sterben die in dem Bereich vorhandenen Zellen ab, was im schlimmsten Fall im Tod des Individuums resultieren kann. (Bilder modifiziert nach Servier Medical Art)

3.1.1 Die inflammatorische Phase

Die inflammatorische Phase setzt kurz nach Beginn des Infarktes ein. Die entstehende Sauerstoffarmut verringert die Integrität der Endothelzellen und sorgt somit für ein durchlässiges Endothel. Dies weitet sich bei anhaltender Hypoxie auch auf die Kardiomyozyten aus und induziert in diesen Nekrose.⁹ Nekrotische Zellen schütten verschiedene DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), wie z.B. ATP aus, welche daraufhin an PRRs (*pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems binden und zur Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine führen.¹⁰⁻¹³ Zu den wichtigsten PRRs gehören TLRs (*toll-like receptors*), wobei im Herzen insbesondere TLR4, TLR2, TLR3 und TLR5 exprimiert werden. So konnte u. a. gezeigt werden, dass nach einem Infarkt TLR4 verstärkt auf zirkulierenden Leukozyten zu finden ist. Ebenso konnte eine erhöhte Expression des TLR2 auf Monozyten nachgewiesen werden.¹⁴⁻¹⁷ Beide sorgen für die Aktivierung von NF- κ B, dem bei Entzündungsprozessen wichtigsten Transkriptionsfaktor im Herzen. NF- κ B induziert die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine, aber auch Adhäsionsmoleküle und Chemokine. Im menschlichen Organismus konnte nach einem akuten Herzinfarkt ebenso eine Heraufregulation von NF- κ B in zirkulierenden Leukozyten nachgewiesen werden.¹⁸

Nekrotische Kardiomyozyten sind der Hauptauslöser für die postinfarzielle inflammatorische Antwort. Daneben spielen allerdings auch Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes eine entscheidende Rolle. Diese werden durch die Aktivierung von TLR-Liganden, ROS (*reactive oxygen species*) oder Interleukinen in einen Stresszustand versetzt, so dass sie daraufhin DAMPs sowie Interleukine heraufregulieren und sekretieren.^{19,20} Ein weiterer wichtiger Effekt der DAMPs ist die Aktivierung von Endothelzellen, welche daraufhin P-Selektine aus ihren Weibel-Palade Körpern entlassen, E-Selektine heraufregulieren und diese zur Oberfläche transportieren.²¹ Selektine sind für die Bindung von Leukozyten an das Endothel und die darauf folgende Migration in das Gewebe essentiell.²² Durch die Aktivierung des Endothels dient es nun ebenfalls als Quelle für Zytokine und Chemokine.^{23,24} Auch Fibroblasten im Herzen werden durch DAMPs aktiviert und sekretieren eine Vielzahl inflammatorischer Zytokine.²⁵

Zu den ersten einwandernden Leukozyten zählen die neutrophilen Granulozyten.^{9,26} Neutrophile Granulozyten gehören zu den polymorphnukleären Zellen, welche im Knochenmark gebildet werden, ein Vorgang, der als Granulopoese bezeichnet wird. Messungen aus den 70er Jahren belegen eine tägliche Produktion von Neutrophilen im Knochenmark von ca. $0,85 \times 10^9$ pro kg Körpergewicht.²⁷ Wichtigster Faktor für die Granulopoese ist G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*). Dieses Zytokin sorgt zum einen für eine verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren, welche die myeloiden Vorläufer in Richtung Granulozyten differenzieren, zum anderen ist es essentiell für die Freisetzung der Granulozyten aus dem Knochenmark.²⁸ Danach zirkulieren sie im Blutstrom, wobei allerdings der größte Anteil an neutrophilen Granulozyten im Knochenmark verweilt und nur ein geringer Teil in der Peripherie zu finden ist. Die Anzahl an Neutrophilen im Blut ist spezieabhängig. Beim Menschen machen sie etwa 50–70 % der Leukozyten aus, wohingegen es bei der Maus nur 10–25 % sind.²⁹ Dabei ist die gemessene Zirkulationszeit jedoch sehr variabel und abhängig von der verwendeten Methode. So konnte in *ex vivo* Studien eine Lebensdauer von 8 h prognostiziert werden, wohingegen bei *in vivo* Experimenten eine Lebensdauer von über 5 Tagen belegt wurde.^{30,31}

Während einer systemischen Inflammation kommt es zu einem Prozess, der auch als Notfall-Granulopoese bezeichnet wird: Endothelzellen erkennen PAMPs z.B. über TLR4 und sekretieren verstärkt G-CSF, welches wiederum für eine Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark sorgt. Parallel induziert G-CSF auch die Bildung von Gro- α (CXCL1) durch Endothelzellen. Gro- α bindet primär an CXCR2 und schwächer an CXCR1 und sorgt durch Aktivierung verschiedenster Signalwege für eine Migration in den betroffenen Bereich. Die Aktivierung läuft dabei über eine G-Protein-gekoppelte Aktivierung der MAPK und der Produktion von IP3. Neben Gro- α ist IL-8 der wichtigste Chemoattraktant für humane neutrophile Granulozyten. Dieses 6-8 kDa große Chemokin kommt sowohl in monomerer als auch dimerer Form vor und bindet sowohl an CXCR1 als auch an

CXCR2, wobei es die Bindung an CXCR1 ist, die primär für Chemotaxis zuständig ist³²⁻³⁴. Hauptsächlich wird IL-8 über CXCR1 gebunden und nur zu geringerem Maße an den CXCR2.

Im Falle einer Entzündung (steril oder unsteril) müssen die Granulozyten zunächst in das betroffene Gewebe eindringen können, ein Vorgang, der als Leukodiapedese bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen hochkomplexen Prozess, welcher eine Vielzahl beteiligter Proteine sowie Schritte voraussetzt. Die erste Annäherung und Interaktion der Granulozyten mit dem Endothel erfolgt über Selektine. In Folge einer Aktivierung der Endothelzellen durch z. B. TNF- α , exprimieren diese verstärkt E- und P-Selektine und interagieren ihrerseits mit P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), welcher dann eine Bindung mit L-Selektinen auf Granulozyten eingehen kann.³⁵ Nach anschließendem Rollen der Granulozyten entlang des Endothels werden diese verstärkt gebunden, um ihnen so im späteren Verlauf die Extravasation zu ermöglichen. Dies geschieht über verschiedene Integrine. Das wichtigste ist CD11a/CD18 (LFA-1), welches mit dem ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) am Endothel interagiert und zu einer verstärkten Bindung führt.³⁶ Daraufhin erfolgt die transendotheliale Migration der Zellen in das betroffene Gewebe (Abb. 3.2).

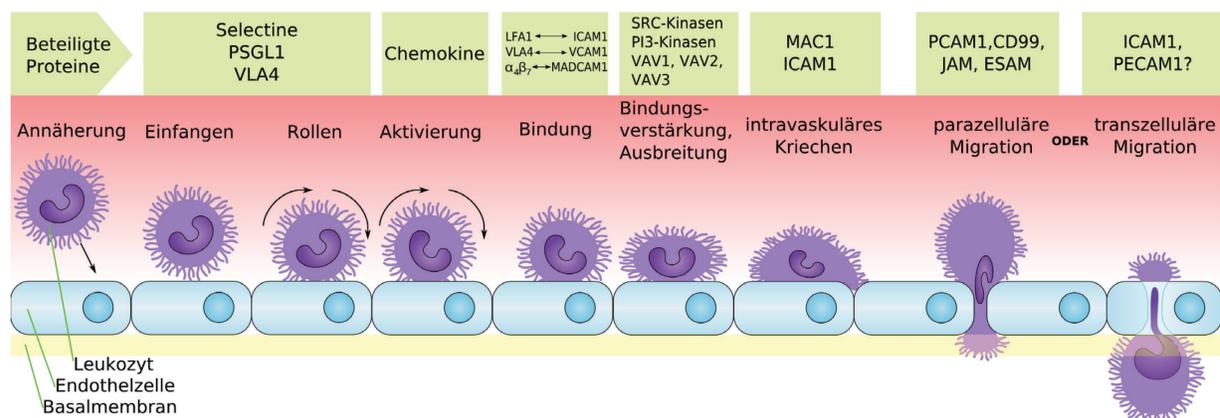


Abbildung 3.2: Leukodiapedese.

Der Vorgang der Leukodiapedese ist hochkomplex und umfasst verschiedene Schritte. Die erste Annäherung sowie das Einfangen der Zellen wird über Selektine reguliert. Die darauf folgende Bindung der Zellen wird durch Integrine, insbesondere CD11a und CD18 eingeleitet. Nach der Bindung erfolgt die transendotheliale Migration in die Zielstruktur. Für den gesamten Vorgang sind die unterschiedlichsten Oberflächenproteine nötig, da es andernfalls zu einer fehlerhaften Migration kommt. (Quelle: http://www.wikiwand.com/en/Leukocyte_extravasation, Besuch am 11.09.2018)

Am Entzündungsort sorgen die neutrophilen Granulozyten durch drei unterschiedliche Mechanismen für die Beseitigung der Pathogene: Die Phagozytose, den oxidativen Ausbruch und die NETose. Im Falle eines Herzinfarktes sekretieren sie verschiedene proteolytische Enzyme und sorgen so für den

Abbau von Matrixtrümmern und verschiedenen Zellbestandteilen und phagozytieren nekrotische Zellen.

Für die Phagozytose ummanteln die Granulozyten die entsprechenden Zielstrukturen, ein Vorgang der durch Bindung von Opsoninen verbessert werden kann. Das Pathogen wird daraufhin in ein Phagosom aufgenommen, welches im weiteren Verlauf mit einem Lysosom verschmilzt und ein Phagolysosom bildet. Aufgrund des sauren pH-Wertes und der lytischen Enzyme, welche in den Lysosomen vorliegen, kommt es zum Abbau der Pathogene.

Der oxidative Ausbruch beschreibt die Herstellung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder hypochloriger Säure (HOCl). Katalysiert werden diese durch die NADPH-Oxidase, welche aus einem Sauerstoffmolekül (O_2) ein Superoxidanion (O_2^-) erzeugt. Dieses wird dann durch die Superoxiddismutase in H_2O_2 umgewandelt, was wiederum von der Myeloperoxidase zu HOCl katalysiert wird. Insbesondere HOCl sorgt für das Abtöten der verschiedensten Pathogene, da es mit DNA, Lipiden und auch Proteinen reagiert.³⁷

Die NETose wurde erst in den letzten Jahren intensiver erforscht und ist wohl der interessanteste Aspekt der Pathogenabwehr durch Granulozyten. Bei NETs (*nuclear extracellular traps*) handelt es sich um DNA-Fasern, die von den Granulozyten ausgeworfen werden und so ein engmaschiges Netz ausbilden.³⁸ In dieses Netz eingebettet sind große Mengen an antimikrobiellen Substanzen, wie z. B. die neutrophile Elastase, die somit für einen schnellen Abbau von eingefangenen Pathogenen sorgen können.^{38,39} Auf die NETose folgt der Zelltod der Granulozyten.⁴⁰

Kurz nach Migration der Granulozyten folgen Monozyten und Makrophagen in zwei aufeinander folgenden Wellen.⁴¹ Die erste Welle ist gekennzeichnet durch $Ly6C^{hi}$ -Monozyten sowie M1-Makrophagen.⁴² Beide zeichnen sich durch einen pro-inflammatorischen Status aus und schütten entsprechende Mediatoren wie IL-6 oder TNF- α aus. Auch residente Mastzellen und Gewebemakrophagen im Herzen werden nach Infarkt aktiviert. Diese besitzen intrazelluläre Depots an pro-inflammatorischen Mediatoren, welche sie daraufhin ins Gewebe entlassen.

3.1.2 Reparation, Proliferation und Maturation

Der Übergang zur reparativen und proliferativen Phase wird u.a. durch die infiltrierten neutrophilen Granulozyten eingeleitet. Diese sezernieren mit der Zeit auch anti-inflammatorische Mediatoren. Zudem exprimieren apoptotische neutrophile Granulozyten Chemokine und Zytokine sowie so genannte „Iss-mich“-Signale (Phosphatidylserine).⁴³⁻⁴⁵ Dies sorgt für die Einwanderung einer zweiten

Welle von Monozyten und Makrophagen und einem phänotypischen Wechsel zu Ly6C^{low}-Monozyten und M2-Makrophagen, beides Zelltypen, die eine anti-inflammatorische Wirkung aufweisen.⁴⁶ Sekretiertes GDF-15, ein Mitglied der TGF- β Familie, sorgt für den Abbau von Selektinen auf dem Endothel und verhindert somit das weitere Einwandern von neutrophilen Granulozyten.⁴⁷ Es kommt zur Ausschüttung von anti-inflammatorischem TGF- β und IL-10 um die Entzündungsreaktion einzudämmen.²³ IL-10 verhindert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen durch Aktivierung des STAT3-Signalweges.⁴⁸ Als wichtigstes anti-inflammatorisches Zytokin gilt TGF- β . Es wird auch als der Kernregulator vom Übergang der Entzündung zur Fibrose angesehen.⁴⁹ So konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten des TGF- β -Rezeptors in der frühen Phase nach MI zu einer erhöhten Mortalität führt, wohingegen eine zelltypspezifische Depletion auf Kardiomyozyten protektive Eigenschaften aufweist.^{50,51} Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes tragen zum Abklingen der Inflammation durch Sekretion von Reg-3 β bei, welches den anti-inflammatorischen Status bei Makrophagen fördert.⁵² Später wandern auch vermehrt T-Zellen in den Infarktbereich ein. Insbesondere die CD4⁺-T-Helferzellen werden nach Infarkt aktiviert und fördern die Wundheilung, das Auflösen der Inflammation sowie die Bildung von Narbengewebe.⁵³

Darüber hinaus spielen in diesem Zusammenhang die Fibroblasten eine wichtige Rolle. Kennzeichnend für die reparative und proliferative Phase ist der Übergang der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche Stressfasern und kontraktile Proteine ausbilden.^{23,54} Der Ursprung dieser Myofibroblasten ist bisher noch nicht im Detail geklärt. Es wird vermutet, dass sie aus den residenten Fibroblasten im Herzen hervorgehen. Nach einer anderen Hypothese stammen sie von zirkulierenden Knochenmarksvorläufern ab, welche in das Herz einwandern.^{55,56} Auch die Extrazellulärmatrix (EZM) wird im Laufe eines Herzinfarktes und der nachfolgenden Heilungsphase mehrfach stark verändert. So werden die verschiedenen EZM-Bestandteile im Infarktbereich vorerst phagozytiert und eine provisorische EZM aus Fibronectin und Fibrin gebildet, an denen die Zellen entlangwandern können.⁵⁷

Die letzte Phase des Infarktes ist gekennzeichnet durch ein Abklingen der Entzündungsreaktion sowie die Narbenbildung und das Ausheilen der Wunde. Die EZM, die zuvor den Zellen als Infiltrationshilfe diente, wird quervernetzt und bildet das Narbengewebe. Die noch vorhandenen reparativen Immunzellen werden durch Apoptose eliminiert, was schließlich zur Auflösung der Entzündungsreaktion führt.

Da insbesondere die initialen Prozesse während eines Myokardinfarktes entscheidenden Einfluss auf die anschließende Heilungsphase haben, nimmt im klinischen Alltag vor allem die rasche Diagnose eines Herzinfarktes sowie dessen Ausmaß eine zentrale Stellung ein, um dann entsprechende

Therapien einzuleiten. Als Goldstandard hierfür hat sich in den letzten Jahren die Magnetresonanztomographie (MRT) entwickelt, welche im Folgenden etwas detaillierter beschrieben wird.

3.2 Magnetresonanstechniken

Die Grundlagen für alle späteren Anwendungen wurden im Jahr 1946 von Felix Bloch und Edward Purcell gelegt: Sie beschrieben damals das Phänomen der Kernspinresonanz, welche die Basis für die spätere NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) legte. Als Väter der Magnetresonanztomographie gelten Damadian und Lauterbur, welche in den 70er Jahren die Voraussetzungen für die Erzeugung von MR-Bildern schufen.

3.2.1 Einige physikalische Grundlagen

Die Theorie der Kernspinresonanz besagt, dass alle Kerne neben ihrer normalen Bewegung (dem Kernspin p) im Magnetfeld noch eine Präzessionsbewegung aufweisen. Der Kernspin ist mit dem magnetischen Kernmoment μ_M über den Proportionalitätsfaktor γ , das gyromagnetische Moment, verbunden.⁵⁸

$$\mu_M = \gamma * p$$

Kernspin und magnetisches Moment sind gequantelt, so dass bei Anlegen eines externen Magnetfeldes zwei energetisch unterschiedliche Populationen vorliegen. Die Energieniveaus sind dabei nach der Boltzmann Verteilung besetzt, wobei gilt:

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{\frac{-\gamma h B_0}{2\pi k T}}$$

Mit N_1 = Kerne im angeregten Zustand; N_0 = Kerne im Grundzustand; h = Planck'sches Wirkumsquantum; k = Boltzmann-Konstante; T = Temperatur in Kelvin.

Durch Einstrahlen eines Radiofrequenzpulses von außen kann man spezifisch Kerne anregen und auf ein energiereicheres Niveau anheben. Dabei ist die Resonanzfrequenz abhängig von der angelegten Magnetfeldstärke B_0 sowie dem gyromagnetischen Moment des entsprechenden Kernes.

$$\omega = \gamma * B_0$$

Allerdings ist das Delta zwischen energiearmem und energiereichem Status sehr gering: Nur etwa einer von 1 Million Kernen befindet sich im energetisch günstigeren Zustand, welcher aber die Basis für die

NMR-Messungen bildet. Da das System nach der Anregung bestrebt ist, wieder in den Grundzustand zurückzukehren, fallen die Kerne auf das günstigere Energieniveau zurück, indem sie Strahlung emittieren (Relaxation). Die hierbei abgegebene Energie ist die Messgröße aller MR-Methoden. Für die Relaxation der Kerne werden zwei Mechanismen unterschieden: Spin-Gitter-Relaxation (Longitudinalrelaxation) und Spin-Spin-Relaxation (Transversalrelaxation). Bei der Spin-Gitter-Relaxation wird die Energie an das umgebende Medium abgegeben. Die Zeit, die benötigt wird, bis die Kerne wieder auf ihrem ursprünglichen Energieniveau sind, wird als T1 bezeichnet. Bei der Spin-Spin-Relaxation wird die Energie an umgebende Kerne übertragen. Die Zeit bis die Kerne relaxiert sind, wird als T2 bezeichnet.^{59,60} Weiteren Einfluss auf das Signal hat das chemische Umfeld der zu messenden Kerne. So lassen sich mittels NMR-Spektroskopie verschiedene chemische Gruppen differenzieren und analysieren. Einige biologisch relevante Kerne, die für die MR-Techniken genutzt werden können, sind ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P .^{59,60} Der meistverwendete Kern ist jedoch der Wasserstoffkern, da dieser zum einen die größte Empfindlichkeit aufweist und zum anderen in biologischen Systemen mit Abstand am häufigsten vorhanden ist.

3.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie ermöglicht durch Einsatz eines Gradientensystems zusätzlich eine dreidimensionale Ortskodierung. Durch das Zuschalten von Gradienten ändert sich die Anregungsfrequenz der Kerne jeweils geringfügig, so dass es möglich ist, aus der emittierten Energie dreidimensionale Abbildungen zu rekonstruieren. Die MRT ist mittlerweile ein Standardverfahren im Klinikalltag und kommt im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren wie SPECT, PET oder CT ohne ionisierende Strahlung bzw. radioaktive Kerne aus und ist daher schonender für den Patienten.⁶¹ Zudem bietet die MRT einen exzellenten Kontrast zwischen verschiedenen Geweben und ermöglicht den Einsatz unterschiedlicher Mapping-Techniken und auch spektroskopische Untersuchungen.^{61,62} Allerdings ist die Unterscheidung bestimmter Gewebestrukturen mit normalen Techniken nur schwierig realisierbar. Daher wurde bereits sehr früh mit der Erforschung und dem Einsatz von verschiedenen Kontrastmitteln begonnen.

3.2.2.1 Kontrastmittel für die MRT

Wie bereits erwähnt, ist der relevanteste Kern für die MRT der Wasserstoffkern ^1H . Da der Mensch zu ca. 80% aus Wasser besteht, ist eine Vielzahl an Wasserstoff vorhanden. Je nach umgebendem Gewebe, sei es Fett oder Liquor, weisen die Kerne unterschiedliche Relaxationseigenschaften auf und

führen so zu einem veränderten Kontrast. Die zusätzlich injizierten Kontrastmittel lassen sich grob in zwei Familien gliedern: Die negativen und die positiven Kontrastmittel.

Negative Kontrastmittel sorgen für eine Auslöschung des vorhandenen Signals. Eine wichtige Gruppe von Vertretern der negativen Kontrastmittel sind die SPIOs (*super paramagnetic iron oxide particles*). Dabei handelt es sich um Partikel mit einem Eisenkern. Bei den Messungen sorgt das Eisen für die Ausbildung eines störenden Magnetfeldes, so dass die T2-Zeiten massiv verkürzt werden, was ein Ausbleiben der Bildinformation im Bereich des Eisens zur Folge hat. Anwendung finden diese insbesondere in der Onkologie zur Detektion von Lebertumoren.^{63,64}

Positive Kontrastmittel sorgen für eine Verstärkung des Signals. Wichtigste Vertreter hierbei sind Gadoliniumchelatkomplexe. Sie führen zu einer verkürzten T1-Zeit, indem sie im ständigen Austausch mit den umliegenden Protonen des Wassers sind. Anwendungen finden sie u. a. in der Kardiologie zur Bestimmung der Infarktgröße nach Herzinfarkt.^{65,66} Da das verletzte Gewebe ein durchlässiges Endothel besitzt, sammelt sich dort das Gadolinium an, führt zu einer verkürzten T1-Zeit und somit zu einem Kontrast im Vergleich zum gesunden Gewebe. Hiermit lässt sich relativ einfach und patientenschonend das Ausmaß eines Herzinfarktes visualisieren. Gadolinium-basierte Kontrastmittel gehören damit auch zu den Goldstandards in der Kardiologie.

Die oben genannten Kontrastmittel weisen allerdings, gerade im Hinblick auf die Inflammationsbildgebung, auch Nachteile auf. So sorgen SPIOs bereits in geringen Konzentrationen für ein großflächiges Auslöschen von Signalen, was die anatomische Zuordnung enorm erschwert. Gadoliniumchelatkomplexe weisen eine hohe Sensitivität auf, jedoch sammeln diese sich unspezifisch in durchlässigen Bereichen des Endothels an und weisen somit keine Spezifität auf. Zudem wird der Einsatz von Gadolinium momentan kontrovers diskutiert. So zeigten sich u. a. Ablagerungen des Gadoliniums im Gehirn und anderen Organen.⁶⁷ Welchen Einfluss dies hat, ist bisher noch nicht geklärt. Gerade im Hinblick auf diese letztgenannten Befunde stoßen alternative positive Kontrastmittel, wie z. B. Perfluorkarbone, auf großes Interesse.

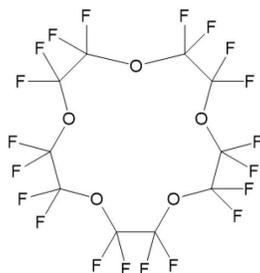
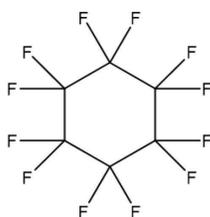
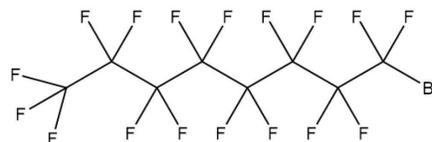
3.3 ¹⁹F-Magnetresonanz-Bildgebung

3.3.1 Perfluorkarbone

Perfluorkarbone sind Moleküle, in denen alle Wasserstoffatome durch Fluor ersetzt sind und die sowohl in linearer als auch in zyklischer Form vorkommen können. Bei sehr kurzer Kettenlänge sind Perfluorkarbone bei Raumtemperatur gasförmig, bei länger-kettigen Verbindungen handelt es sich um

durchsichtige, geruchlose Flüssigkeiten bis hin zu festen Verbindungen, wie dem Teflon. Diese lassen sich aufgrund ihres hohen ^{19}F -Gehalts gut mittels ^{19}F -MRT detektieren. Perfluorkarbone weisen einige Besonderheiten auf, so sind sie z. B. als fluorophil beschrieben, also vorwiegend in Fluor löslich, besitzen allerdings eine höhere Tendenz zur Lipophilie als Hydrophilie. Perfluorkarbone können eine Dichte von bis zu 2 g/ml aufweisen und gelten zudem als chemisch inert und nicht toxisch, was sie für eine *in vivo* Anwendung prädestiniert. Dabei spielt insbesondere die C–F-Bindung eine wichtige Rolle, eine der stärksten Bindungen, welche in der organischen Chemie beschrieben wird. Bisher ist kein Enzym bekannt, das in der Lage wäre, diese Verbindung zu spalten und so die Perfluorkarbone abzubauen.^{68,69}

Perfluorkarbone wurden bereits in den 50iger Jahren von der „Minnesota Mining and Manufacturing“ in großem Maßstab für die industrielle Nutzung hergestellt.⁷⁰ Produziert wurden überwiegend Perfluoroktansäure (PFOA) und Perfluoroktansulfonsäure (PFOS), beides langkettige lineare Verbindungen. Anwendung fanden diese u. a. bei der Herstellung von Teflon, der Imprägnierung von Jacken oder auch als Zugabe in Löschschaum. Mittlerweile gibt es eine kontroverse Diskussion darüber, inwieweit diese Perfluorkarbone Auswirkungen auf die Gesundheit von Menschen haben können. Auslöser war die Aufnahme von PFOS über verunreinigtes Trinkwasser. Eine größere Studie (C8 Health Project) konnte allerdings keinen eindeutigen Einfluss auf die Gesundheit darlegen, wobei dies u. a. auch an der Kohortengröße und der relativ schwierigen Interpretation der Daten lag.⁷¹ Auch bei den zurzeit in der Forschung verwendeten linearen Perfluorkarbonen, wie Perfluoroktylbromid, konnten bisher keine gesundheitsschädlichen Auswirkungen nachgewiesen werden und diese sind unter streng kontrollierten Bedingungen bereits für Patienten zugelassen.^{72–74} In den 90er-Jahren war ihr primäres Anwendungsgebiet als Blutersatzstoffe, da sie sehr gut O_2 binden und CO_2 lösen können. Dieses Verhalten, wie flüssiges Gas zu wirken, gehört zu den interessantesten Eigenschaften der Perfluorkarbone. So konnte in einem eindrucksvollen Experiment gezeigt werden, dass Mäuse in einem Gefäß mit oxygenierten Perfluorkarbonen atmen und längere Zeit überleben können.⁷⁵ Mittlerweile finden sie in verschiedenen klinischen Gebieten Anwendung. So werden flüssige Perfluorkarbone in der Vitreoretinalmedizin eingesetzt, wohingegen flüssige, emulgierte Perfluorkarbone als Kontrastmittel in der Echokardiographie dienen.^{76–79} Ein weiteres bedeutendes Anwendungsgebiet bildet die MR-Bildgebung. Hierbei werden sie innerhalb der Oximetrie und der Inflammationsbildgebung eingesetzt.^{80–86} Es können die verschiedensten Perfluorkarbone genutzt werden, die gebräuchlichsten sind u. a. Perfluorkronenether, Perfluorzyklohexan und Perfluoroktylbromid (Abb. 3.3). Allerdings stellt für eine biologische Anwendung die starke Hydrophobie dieser Perfluorkarbone ein großes Problem dar. Daher wurde bereits frühzeitig damit begonnen, Perfluorkarbone zu emulgieren und so für eine biomedizinische Anwendung zu optimieren.

Perfluorkronenether**Perfluorzyklohexan****Perfluoroktylbromid****Abbildung 3.3: Übersicht über verschiedene Perfluorkarbonate.**

Schematische Darstellungen von Perfluorkronenether, Perfluorzyklohexan und Perfluoroktylbromid. Aufgrund der verschiedenen chemischen Umgebungen der Fluorkerne, besitzen alle drei unterschiedliche ^{19}F -MR-Spektren und lassen sich so mittels NMR-Spektroskopie oder MRT unterscheiden.

3.3.2 Perfluorkarbon-Nanoemulsionen**3.3.2.1 Nanoemulsionen**

Als Alec Douglas Bangham 1964 als erster die Liposome beschrieb, wurden die Vorteile dieses Modellsystems sehr schnell realisiert und für weitere Forschungszwecke nutzbar gemacht.⁸⁷ Liposomen bestehen aus Phospholipiden, welche sich in wässriger Phase unter geeigneten Bedingungen (Ultraschall, Extruder) zu einer Lipiddoppelschicht arrangieren. Dabei weisen die hydrophilen Kopfgruppen zum wässrigen Milieu und die lipophilen Schwanzgruppen schirmen sich gegenseitig ab. Der Vorteil von Liposomen beruht zum einen darauf, dass sie als Modellmembransystem fungieren können, zum anderen stellen sie ein einzigartiges *drug delivery system* dar.⁸⁸⁻⁹⁰ Dabei können aufgrund der oben beschriebenen Beschaffenheit von Liposomen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen in die Lipidschicht eingebaut oder aber auch in der wässrigen Phase verpackt werden.

Unter einer Emulsion versteht man ein Gemisch zweier normalerweise nicht mischbarer Flüssigkeiten. Unterschieden werden diese grob in Öl-in-Wasser (o/w) und Wasser-in-Öl (w/o) Emulsionen, wobei die Größe der Droplets von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern reicht. Je geringer die Tröpfchengröße der Emulsionen, desto transparenter erscheint das Gemisch, da die Lipidpartikel irgendwann kleiner als die Wellenlänge des Lichts werden ($d < \lambda$).

Um Komplikationen bei der intravenösen Anwendung von Emulsionen zu vermeiden, dürfen diese nicht größer sein als die kleinsten Gefäße (Kapillare), da dies sonst zu Embolien führen kann.⁹¹ Daher finden für medizinische Zwecke vor allem Nanoemulsionen bevorzugt Anwendung. Als

Nanoemulsionen bezeichnet man üblicherweise Emulsionen von einer Tröpfchengröße zwischen 20 und 200 nm. Aufgrund dieser geringen Tröpfchengröße handelt es sich bei Nanoemulsionen um thermodynamisch metastabile Systeme, welche danach streben, die Grenzflächenspannung durch Verringerung der Phasengrenzfläche zu reduzieren.⁹² Die Folge ist eine Vergrößerung des Radius über die Zeit.

3.3.2.2 Herstellung von Nanoemulsionen

Essentiell für die Herstellung von Nanoemulsionen sind Energie sowie ein Emulgator. Unter einem Emulgator versteht man ein amphipathisches Molekül, also ein Molekül, welches sowohl hydro- als auch lipophile Eigenschaften aufweist. Standardmäßig werden als Emulgatoren für Nanoemulsionen Phospholipide oder Poloxamere verwendet.^{92,93} Beide Gruppen weisen dabei verschiedene Vor- und Nachteile auf. So sind Phospholipide sehr preisgünstig und haben eine sehr gute Biokompatibilität. Allerdings sind sie anfällig für Hydrolysierungen und Oxidationsprozesse, was Einfluss auf die Stabilität nehmen kann. Poloxamere sind Blöcke aus Polyethylenglykol-Polypropylenglykol-Polyethylenglykol und werden im Vergleich zu den Phospholipiden in deutlich höherer Konzentration gebraucht. Zudem kann es bei einer *in vivo* Anwendung zur Aktivierung des Komplementsystems kommen.⁹⁴

Für die Herstellung von Nanoemulsionen können verschiedene Methoden eingesetzt werden, welche mechanischer (*high-energy emulsification*) oder chemischer (*low-energy emulsification*) Art sein können.⁹⁵ Zu den mechanischen Methoden zählt man die Hochdruckhomogenisation, den Ultraschall und die Mikrofluidizer. Chemische Methoden sind die Phaseninversion sowie die Diffusionsmethode. Da die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Emulsionen alle mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden, wird insbesondere auf dieses Verfahren näher im Detail eingegangen. Allen genannten Verfahren ist aber gemein, dass hoher Scherstress sowie Kavitation die Hauptprinzipien der Partikelruptur sind, welche zur Erzeugung einer gleichförmigen Nanoemulsion genutzt wird.

Bei der Hochdruckhomogenisation handelt es sich um eine der praktikabelsten Methoden, um Emulsionen in großen Mengen anzufertigen. Hierzu wird zunächst eine so genannte Prä-Emulsion zubereitet. Dazu werden alle benötigten Lipide und Zusätze zusammengemischt und mit etwas Puffer voremulgiert, so dass eine grobe Emulsion mit Partikeln im höheren µm-Bereich entsteht. Diese werden dann im Hochdruckhomogenisator zu Nanoemulsionen geformt. Der dabei ablaufende Prozess ist folgender: Die Probe wird in eine Kammer gesaugt und anschließend mittels variierbarem Kolbendruck (ca. 500–2000 bar) durch eine Verengung gepumpt. Da nach dem Prinzip von Bernoulli

die Summe von hydrostatischem und dynamischem Druck jeweils gleich bleibt, kommt es zu einer Verringerung des hydrostatischen Druckes, wenn der dynamische Druck in Folge der Verengung zunimmt. Der hydrostatische Druck fällt bis unter den Dampfdruck des Dispergators, so dass es zur Kavitation, zur Bildung von Gasbläschen, kommt. Nach der Verengung kommt es wieder zu einem Abfall des dynamischen Druckes und somit zu einer Zunahme des hydrostatischen Druckes, so dass die Gasbläschen implodieren. Diese Implosion führt zu intensiven Schockwellen, welche für die Ruptur der großen Partikel verantwortlich sind. Standardmäßig werden Nanoemulsionen bei 500–2000 bar und über etwa 5–10 Zyklen hinweg hergestellt (Abb. 3.4).

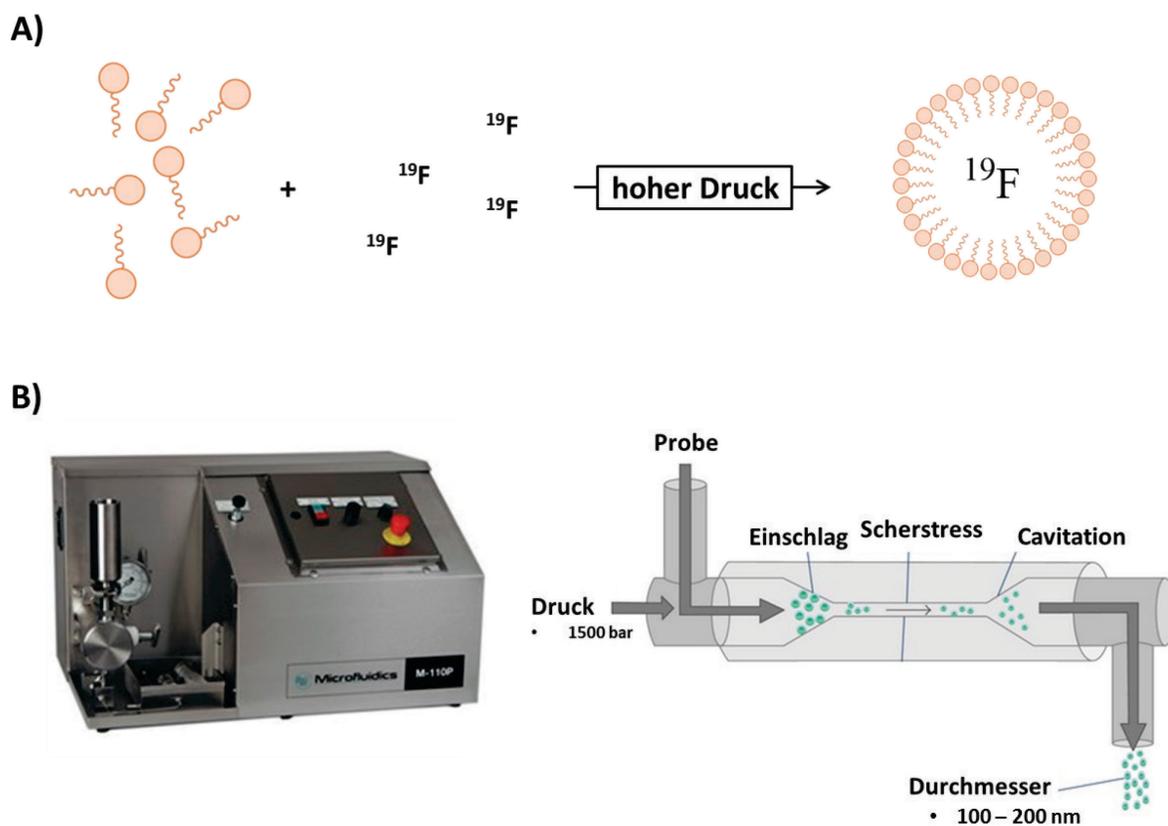


Abbildung 3.4: Überblick über den Herstellungsprozess von Nanoemulsionen.

A) Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs). Die benötigten Bestandteile (Phospholipide, Puffer, Perfluorkarbone) werden zusammengemischt, prä-emulgiert und anschließend unter hohem Druck emulgiert. **B)** Gezeigt ist der in dieser Arbeit zur Herstellung von Nanoemulsionen verwendete Mikrofluidizer M-110P sowie der allgemeine Prozessierungsweg. Die Probe wird in einen Kolben gesaugt, welcher den Flüssigkeitsstrom mittels Druck durch eine Verengung presst und so einen Scherstress bedingt. Es kommt aufgrund fallenden statischen Druckes zur Kavitation. Am Ende der Verengung sorgt dies für die Partikelruptur. Durch zyklisches Durchlaufen dieses Prozesses werden Nanoemulsionen geformt.

3.3.2.3 Charakterisierung & Stabilität von Nanoemulsionen

Eine genaue Charakterisierung der hergestellten Nanoemulsionen ist wichtig, da Unterschiede in der Größe oder im ζ -Potenzial großen Einfluss auf die spätere *in vivo* Verteilung haben. Mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie lassen sich Größe, Größenverteilung (Polydispersionsindex) sowie die oberflächliche Ladung der Partikel (ζ -Potenzial) bestimmen. Ein weiteres wichtiges Verfahren ist die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM), mit der man z. B. die Größe der Partikel bestimmen kann, aber auch den Anteil an leeren Liposomen. In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung primär mittels PCS vorgenommen und nur in Einzelfällen auf die Kryo-TEM zurückgegriffen.

Die Stabilität von Nanoemulsionen wird im Wesentlichen von Ostwald-Reifung und Koaleszenz beeinflusst. Bei der Ostwald-Reifung handelt es sich um einen von Willhelm Ostwald Anfang des 19. Jhd. entdeckten Prozess. Dieser bewirkt, dass es bei einer Dispersion zu einem ständigen Strom von Materie von den kleinen Emulsionsteilchen in Richtung der größeren kommt, da der Dampfdruck bei den Kleineren ungleich höher ist als bei den Größeren. Letztendlich beschreibt es ein Anwachsen größerer Emulsionspartikel auf Kosten der Kleineren.⁹⁶ Die Koaleszenz hingegen ist ein Effekt bei dem zwei Emulsionen unter Abschnürung kleinerer Liposomen zu einer größeren Emulsion verschmelzen. Beide Vorgänge haben starke Auswirkungen auf die Partikelgröße und die Größenverteilung (Abb. 3.5).

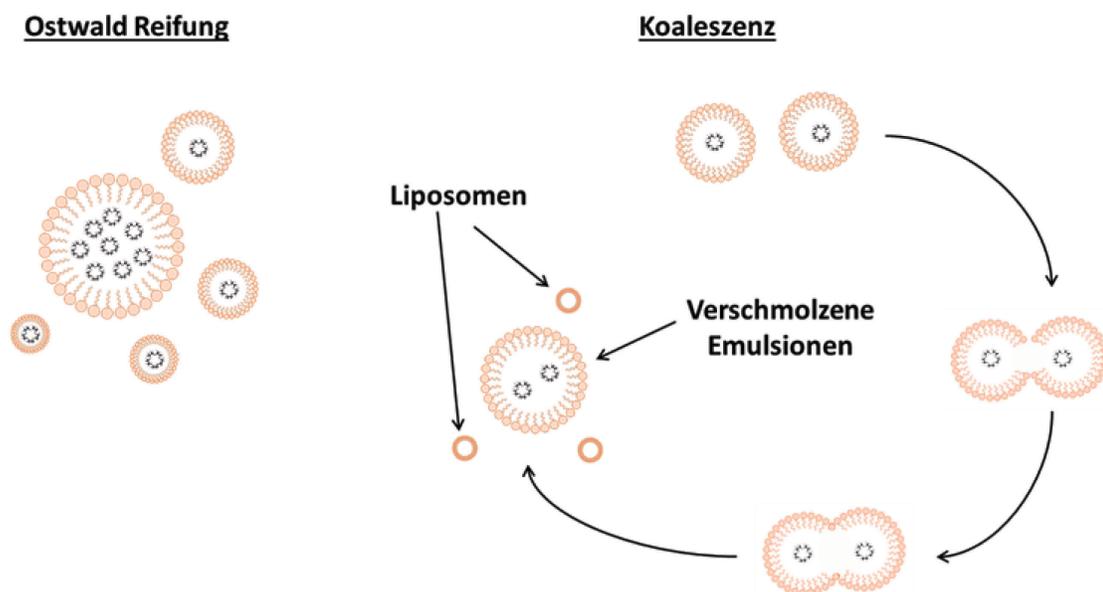


Abbildung 3.5: Koaleszenz und Ostwald Reifung.

Schematische Darstellung der Ostwald-Reifung (links) sowie der Koaleszenz (rechts). Durch Dampfdruckunterschiede kommt es bei der Ostwald-Reifung zu einer Umverteilung der dispergierten Phase von kleineren Partikeln zu größeren. Die Koaleszenz hingegen beschreibt das Verschmelzen zweier Emulsionen unter Abschnürung kleinerer Liposomen. Beide Effekte haben Auswirkung auf die Stabilität der Partikel.

Das Ausmaß der Ostwald-Reifung und der Koaleszenz wird u. a. durch das ζ -Potential der Nanoemulsionen beeinflusst. Dieses spiegelt vereinfacht die oberflächliche Ladung der Partikel wieder. Bei sehr stark negativem ζ -Potential stoßen sich die Partikel gegenseitig stärker ab, was die Koaleszenz verringert.

Bei Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) handelt es sich um Emulsionen, bei denen Perfluorkarbonate als dispergierte Phase und die Lipide als Emulgator dienen. Wie bereits erwähnt, wurden PFCs aufgrund ihrer hohen Sauerstoffaffinität im Rahmen der Entwicklung künstlicher Blutersatzstoffe intensiv erforscht.⁹⁷ Allerdings verlor diese Anwendung in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung, da weitere Funktionen neben der Sauerstoffbindung von den PFCs nicht erfüllt werden konnten. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist mittlerweile die Inflammationsbildung mittels ^{19}F -MRT.⁸⁰

3.3.3 Bildgebung von Entzündungsprozessen mittels PFCs und ^{19}F -MRT

Nach intravenöser Gabe von PFCs werden diese von zirkulierenden, phagozytotisch aktiven Immunzellen aufgenommen. Im Falle einer Inflammation wandern diese Zellen aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe ein. Da im Körper nahezu keine Fluorverbindungen vorkommen, lässt sich dies mittels ^{19}F -MRT hintergrundfrei detektieren und in Kombination mit ^1H -MRT anatomisch zuordnen. Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Methode für eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder adaptieren, um so u. a. Herzinfarkt, Artherosklerose, Hirnschlag oder auch Thromben nachzuweisen (Abb. 3.6).⁸⁰⁻⁸⁶ Die Fluorbildgebung ist somit eine elegante Methode entzündliche Prozesse nicht-invasiv *in vivo* darzustellen.

Allerdings ist dieses ‚passive Targeting‘ auf phagozytierende Zellpopulationen beschränkt. Um einen tieferen Einblick in die Geschehnisse um den Entzündungsherd zu gewinnen, ist es jedoch von großem Interesse den oben beschriebenen Ansatz auch zur Visualisierung anderer Immunzellpopulationen (wie z. B. T- und B-Zellen) einzusetzen. Hierfür ist ein aktives Targeting der PFCs nötig, welches den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet.

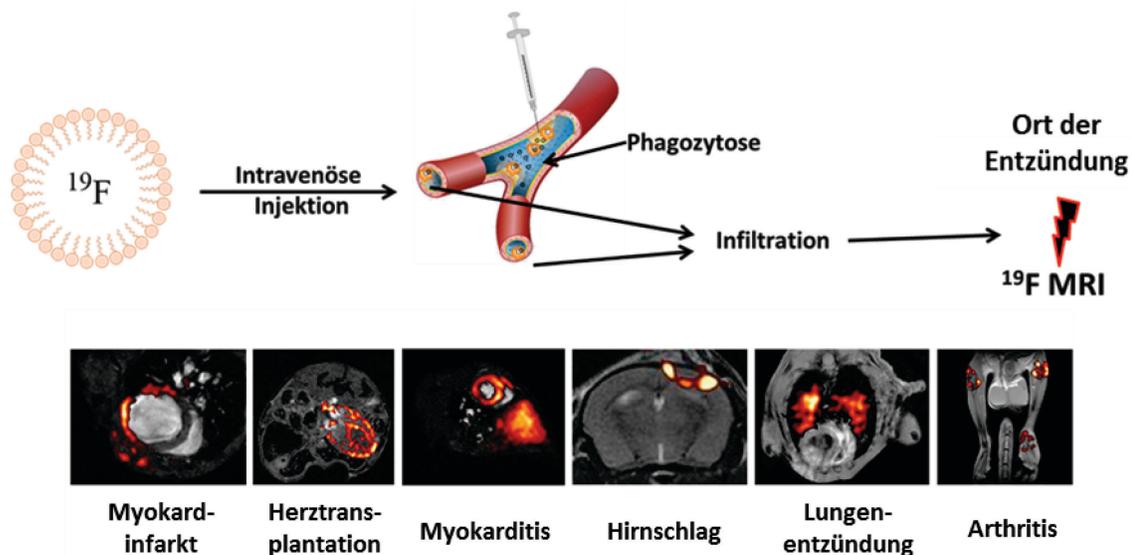


Abbildung 3.6: ^{19}F -Inflamationsbildgebung.

Für Bildgebung von Entzündungsprozessen werden perfluorkarbonhaltige Nanoemulsionen (PFCs) intravenös appliziert und zirkulieren im Blutstrom. Dort werden sie von phagozytisch aktiven Immunzellen aufgenommen (Blutmonozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten) und im Falle einer Inflammation wandern diese Zellen in den Entzündungsbereich ein. Durch hintergrundfreie ^{19}F -MRT lässt sich so die Inflammation darstellen und durch einen parallel durchgeführten ^1H -MRT anatomisch exakt zuordnen. Flögel et. al nutzten dieses Konzept als erste zur Visualisierung von entzündlichen Prozessen und wandten es auf eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder an, u. a. den Herzinfarkt, die Transplantationsabstoßung, den Hirnschlag oder auch die Arthritis.

3.3.4 Oberflächenmodifikation von PFCs und aktives Targeting

Um gezielt einzelne Zellfraktionen über ein aktives Targeting anzusteuern, müssen verschiedene Oberflächenmodifikationen an den PFCs vorgenommen werden. Prämisse für eine gezielte Ansteuerung spezifischer Epitope ist zunächst die Abschirmung der Emulsionen gegenüber phagozytisch aktiven Zellen, was über eine PEGylierung der Emulsionen gewährleistet wird.

3.3.4.1 PEGylierung von PFCs

Als PEGylierung wird der Einbau von Polyethylenglykol in die Hülle der Nanoemulsion bezeichnet. Das PEG kann während des Herstellungsprozesses als Lipidkonjugat zu der Prä-Emulsion gegeben oder auch im Nachhinein über eine Cholesterolgegruppe in die fertige Emulsion integriert werden. Hierbei dient die PEGylierung als sterische Barriere und verhindert so ein Binden von Serumproteinen und die Ausbildung einer Corona. Die PEG-Ketten fungieren dabei wie eine Art Feder. Kommt es zur Bindung von Serumproteinen an die Nanoemulsionen durch Van-der-Waals- oder andere Kräfte,

werden die PEG-Ketten gestaucht, nehmen Energie auf und geben diese daraufhin wieder ab, indem sie die Serumproteine abstoßen.⁹⁸ Die Flexibilität der Ketten korreliert dabei mit der Kettendichte. Ausgedrückt werden kann dies durch die Formel $h \propto N * \sigma^v$, wobei h für die Länge des Polymers steht, N für den Grad der Polymerisierung, σ für die Kettendichte und v für einen Exponent zwischen 0 und 1, abhängig von der Löslichkeit. Dieser Effekt tritt allerdings erst ab einer Kettenlänge von 2000 kDa auf, dies entspricht in etwa einer Länge von 12 nm.^{99–101} Ebenfalls von Bedeutung ist die Menge des verwendeten PEGs. Bei geringen Konzentrationen befinden sich die PEG-Ketten in der so genannten „Pilz“ Konformation (Abb. 3.7), bei der ein Großteil der Ketten nahe der Partikeloberfläche angesiedelt ist. Erhöht man die Konzentration gehen die PEG-Ketten in die „Bürsten“ Konformation über. Hierbei sind die Ketten im Wesentlichen starr nach außen ausgerichtet. Ideal ist ein Zustand zwischen „Pilz“ und „Bürste“, um für die optimale Barriere und gleichzeitige Flexibilität zu sorgen (Abb. 3.7).¹⁰² Dabei hat sich gezeigt, dass dieser bei 5–10 mol% erreicht ist, bei höheren Werten geht der Effekt der Abschirmung durch eine zu hohe Dichte und dem damit einhergehenden Verlust der Flexibilität verloren.¹⁰³

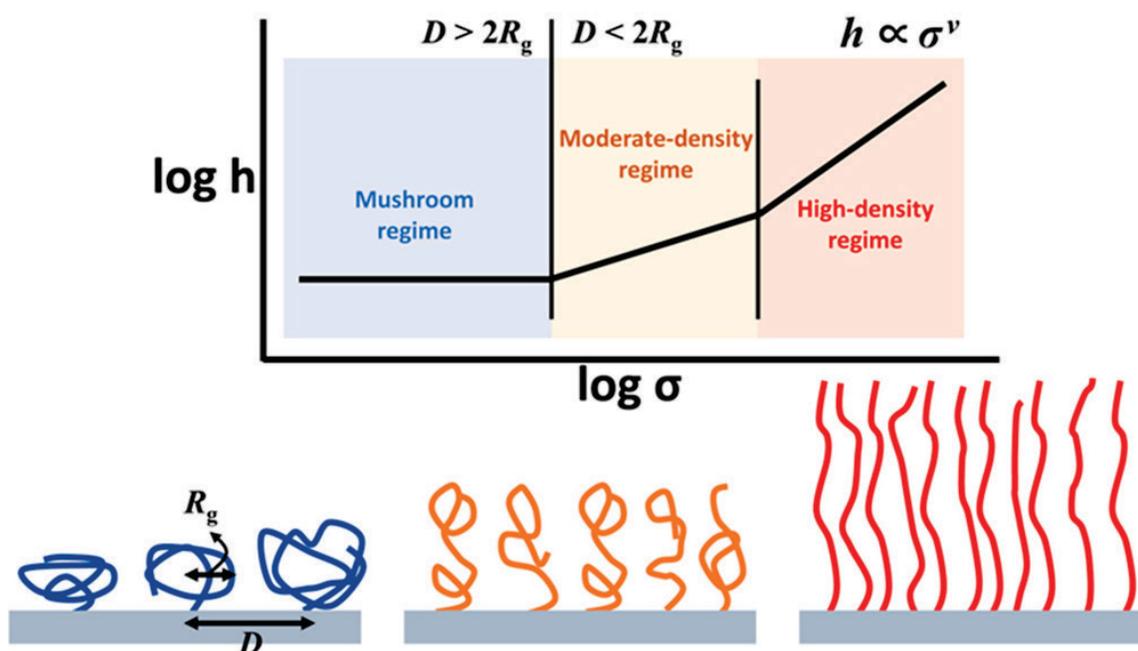


Abbildung 3.7: Einfluss der PEG-Mengen auf den Abschirmungseffekt.

Einfluss der PEG-Dichte auf die Konformation an der Oberfläche von Emulsionen. Ist der Abstand zwischen zwei einzelnen PEG-Ketten größer als der doppelte Radius, nimmt die PEG-Kette eine Pilz-Konformation ein. Bei Erhöhung der Kettendichte verringert sich der Abstand zwischen zwei Ketten unter den doppelten Radius und die Konformation geht in einen Zwischenbereich zwischen Pilz und Bürste über. Bei weiterer Erhöhung der Kettendichte sind die PEG-Ketten so dicht gepackt, dass ein kompaktes Netzwerk ausgebildet wird und die sogenannte Bürstenkonformation entsteht. (Modifiziert nach Gopalan et al.)

3.3.4.2 Aktives Targeting von Zellen

Ein aktives Targeting von Zellen hat zum Ziel, dass im Idealfall nur eine Zellfraktion mit PFCs markiert und anschließend detektiert wird. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: Zum einen können Zellen *ex vivo* mit entsprechenden Kontrastmitteln beladen und anschließend re-implantiert werden oder aber die Kontrastmittelgabe erfolgt direkt *in vivo*. So wurden u. a. dendritische Zellen und T-Zellen von Mäusen *ex vivo* mit PFCs beladen und anschließend *in vivo* mittels ^{19}F -MRT visualisiert.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Am intensivsten wurde bislang das Beladen von humanen dendritischen Zellen untersucht. Hier wurde nicht nur deren Markierung optimiert, sondern auch eine dadurch bedingte Änderung in der Viabilität, der Zytokinproduktion, der Kapazität der T-Zell-Stimulation und mehrerer anderer Parameter untersucht.¹⁰⁸ Neben den PFCs haben auch andere Kontrastmittel für eine *ex vivo* Beladung von Immunzellen Verwendung gefunden. So wurden u. a. SPIOs für ein Lymphozytentracking verwendet. Dies wurde durch den Einsatz von Transfektionsreagenzien erreicht, wie auch durch ein rezeptorvermitteltes Beladen über CD11c an dendritische Zellen.¹⁰⁹⁻¹¹³ Über diese ersten Versuche hinaus sind mittlerweile auch präklinische Studien durchgeführt worden, um z. B. T-Zellen, natürliche Killerzellen und auch dendritische Zellen während einer Tumorerkrankung zu verfolgen.¹¹⁴⁻¹¹⁹

Im Gegensatz zur *ex vivo* Immunzellbeladung muss für einen *in vivo* Ansatz zunächst die Aufnahme durch phagozytotisch aktive Zellen verhindert werden, da diese in steter Konkurrenz mit den Zielzellen stehen. Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, eignet sich eine PEGylierung der Oberfläche zur Abschirmung der Partikel. Anschließend können die PFCs an die Zielzelle der Wahl dirigiert werden, was durch Kopplung von Antikörpern, Antikörperfragmenten, Peptiden oder auch Zuckerstrukturen an die PFC-Oberfläche erreicht werden kann.¹²⁰ Hierfür eignet sich der Einbau einer aktiven chemischen Gruppe in die Emulsion, wie z. B. eine Maleimidgruppe, eine Form der *click chemistry*.¹²¹ Das Maleimid reagiert sehr spezifisch mit Thiolgruppen, so dass man relativ einfach eine Kopplung mit vorhandenen Cysteinresten durchführen kann. Mit diesem Ansatz sind aber bisher nur sehr wenige *in vivo* Anwendungen in der Literatur beschrieben. So wurden spezifische Emulsionen verwendet, um in Mäusen Schädel-Hirn-Traumata nachzuweisen,¹²² während in einer weiteren Studie durch Kopplung eines RGD-Peptides an PFCs ein muriner Hirntumor dargestellt werden konnte.¹⁰³

4. Zielsetzung

In den letzten Jahren ist die Fluorbildgebung zunehmend in den Fokus der MR-Bildgebung gerückt. Fluor kommt im Körper normalerweise nicht vor und ist daher als Kontrastmittel komplett hintergrundfrei. Die bisherige Anwendung ist die Visualisierung von Entzündungsprozessen durch passives Targeting mittels Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs). Dazu werden PFCs in den Organismus injiziert, welche daraufhin von phagozytotischen Zellen, insbesondere den Monozyten, aufgenommen werden. Im Falle einer Inflammation wandern diese Zellen zum Ort der Entzündung und lassen sich durch die Fluorbildgebung hintergrundfrei detektieren. Dadurch läßt sich das Ausmaß der Inflammation sehr gut abschätzen, die jeweils beteiligten Immunzellsubtypen können jedoch nicht identifiziert werden, da es sich um eine rein passive Aufnahme der Partikel in verschiedene zur Phagozytose befähigte Zellen handelt.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Emulsionen derart zu modifizieren, dass nur eine spezifische Immunzellfraktion angesteuert wird und dadurch ein zellspezifischer Nachweis mittels nicht-invasiver Fluorbildgebung ermöglicht wird. Dafür wurde zunächst der Einfluss einer Oberflächenmodifikation mit Polyethylenglykol sowie die Größe der PFCs auf die passive Aufnahme phagozytotischer Zellen untersucht werden. Darauf aufbauend sollte zum einen durch Verwendung eines spezifischen Peptids die Bindung der Emulsionen an humane neutrophile Granulozyten ermöglicht werden. Zum anderen wurde ein synthetisches System etabliert, welches es ermöglicht, eine beliebige Zellfraktion über ein artifizielles GFP-System mit den Emulsionen anzusteuern und dadurch mittels Fluorbildgebung nachzuweisen.

Das übergeordnete Ziel der Arbeit war somit, die Basis für ein hochspezifisches nicht-invasives Immunzelltracking mittels ^{19}F -MRT zu etablieren.

5. Materialien

5.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Typenbezeichnung</u>
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz)	PA214
	Kern (Balingen, Deutschland)	AEJ
Autoklav	F. & M Lautenschläger (Köln, Deutschland)	5169
Chemolumineszenz Imager	Intas (Göttingen, Deutschland)	Intas ECL Chemilum Imager
Durchflusszytometer	BD Biosciences (San Jose, USA)	FACSCANTO II
	BD Biosciences (San Jose, USA)	LSR FORTESSA
Digitalkamera	Olympus (Hamburg, Deutschland)	F-View, UC30
Gelelektrophoresesysteme	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)	BioRad Powerpack HC mit Biorad Mini Protean 3 cell
Heizblöcke	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Thermomixer compact
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Thermomixer comfort
Inkubator	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heracell 150 i
Magnetrührer	MP Biomedicals (Santa Ana, USA)	FastPrep-24
Mikrofluidizer	IKA-Werke (Staufen, Deutschland)	Ultra Turrax TP 18/10
Mikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland)	BX 61

	Olympus (Hamburg, Deutschland)	CKX31
Mikroplatten Reader	Tecan (Männedorf, Schweiz)	Infinite M200 Pro
Mikrotiterschüttler	IKA (Staufen, Deutschland)	MTS 2/4
MR-Microimagingssystem	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	Mini 0.5
MR-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	30mm-Birdcage
	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	45mm-Quadratur
MR-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	400MHz Bruker AVANCE III Widebore
Nano-Drop	Thermo Fisher (Rockford, USA)	NanoDrop2000
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland)	766 Calimatic
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Research
Plattenschüttler	IKA Werke (Staufen, Deutschland)	MTS 2/4
Polarisationsfilter	Olympus (Hamburg, Deutschland)	U-Ant, U-Pot
Rollenmischer	CAT (Staufen, Deutschland)	RM5
Sterilbank	Labogene (Lyngø, Dänemark)	Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2
Transblotsystem	BioRad Laboratories (Hercules, USA)	Transblot turbo transfer system
Scanner	Canon (Krefeld, Deutschland)	Canon LiDE 700F
Vakuum-Absaugsystem	HLC (Pforzheim, Deutschland)	AC 04
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland)	

	neoLab (Heidelberg, Deutschland)	Vortex-Genie 2
Zentrifugen	Beckman Coulter (Brea, USA)	Allegra X-30R
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5415R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Megafuge 16R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Biofuge Primo P

5.2 Chemikalien & Reagenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Cholesterol-PEG ₂₀₀₀ -Maleimid	Nanocs (USA)
Cholesterol-PEG ₂₀₀₀ -Biotin	Avantilipids (USA, Alabama)
Collagenase <i>Clostridium histolyticum</i>	Serva, (Deutschland, Heidelberg)
DPBS	Biofroxx (Deutschland, Einhausen)
DSPE-FITC	Avantilipids (USA, Alabama)
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Avantilipids (USA, Alabama)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Biotin	Avantilipids (USA, Alabama)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Maleimid	Avantilipids (USA, Alabama)
DSPE-RhodaminB	Avantilipids (USA, Alabama)
FCS	Biochrom (Deutschland, Berlin)
Formaldehyd Lösung 4%	PanReac AppliChem (Deutschland, Darmstadt)
G-CSF	R&D System (USA, Minneapolis)
Glutamax	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Gro- α	R&D System (USA, Minneapolis)

HEPES	Thermo Fisher (USA, Rockford,)
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
IL-8	R&D System (USA, Minneapolis)
LPS <i>Salmonella typhimurium</i>	Calbiochem (Deutschland, Darmstadt)
Maleimid-PEG ₂₀₀₀ -Biotin	Thermo Fisher (USA, Rockford)
Matrigel Matrix	Corning (USA, Bedford)
MEM NEAA	Thermo Fisher (USA, Rockford)
Natrium Pyruvat	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Deutschland, Berlin)
Percoll	GE Healthcare (Vereinigtes Königreich, Little Chalfont)
Perfluorkronether	ABCR (Deutschland, Karlsruhe)
S75	Nanocs (USA)
Trypsin/EDTA	Gibco (USA, Rockford)

5.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
6-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
12-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
48-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
96-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
15 ml-Falcon	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
50 ml-Falcon	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)

EASYstrainer 40 µm, 70 µm, 100 µm	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Eppendorfggefäß (250 µl, 500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Erlenmeyerkolben 500 ml	Duran (Deutschland, Wertheim)
Flügelpunktionskanüle 23 g, 27 g	BD Bioscience (Deutschland, Heidelberg)
Glasgefäße 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	Duran (Deutschland, Wertheim)
Isofluran	Actavis GmbH (Österreich, Wien)
Klebefolie	Bio-Rad (Deutschland, Düsseldorf)
Parafilm	Bemis (USA, Wisconsin)
Pipettenspitzen	StarLab (Deutschland, Hamburg)
Skalpell	Feather Safety Razor Co. (Japan, Osaka)
Spritze	Becton Dickinson (USA, New Jersey)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Thincert Cell Culture Inserts 24 Well	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Zeba Spin Columns and Plates, 7 kDa MWCO	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 275 cm ²	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Zellkulturschalen 10 cm	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)

5.4 Antikörper

<u>Spezifität</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Klon</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Firma</u>
CD45	APC	HI30	Human	Biolegend
CD45	PE-Cy7	30-F11	murin	BD Biosciences
CD11b	PE-Cy7	ICRF44	Human	BD Biosciences
CD11b	APC	M1/70	murin	Biolegend

CD14	PerCP-Cy5.5	M5E2	Human	BD Biosciences
CD15	APC	HI98	Human	BD Biosciences
CD16	APC-Cy7	3G8	Human	BD Biosciences
Ly6G	PE	1A8	murin	BD Biosciences
Ly6C	APC-Cy7	AL-21	murin	BD Biosciences
MHCII	FITC	M5/114.15.2	murin	Miltenyi Biotec
CD3	V500	500A2	murin	BD Biosciences
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	murin	BD Biosciences
CD8	APC-Cy7	53-6.7	murin	BD Biosciences
CD63	PE-Cy7	HSC6	Human	eBiosciences
CD66b	APC	G10F5	Human	eBiosciences
CD181	FITC	eBio8F1-1-4	Human	eBiosciences
CD182	PE	eBio58E-C7-F10	Human	eBiosciences

5.5 Puffer

<u>Name</u>	<u>Zusätze</u>	<u>Konzentrationen</u>
DMEM high glucose	FCS	10 %
	Penicilin/Streptomycin	1 %
	Glutamax	1 %
	MEM NEAA	1 %
	Natrium-Pyruvat	1 %
Lysepuffer für Erythrozyten	Ammoniumchlorid	8,29 mg/ml
	Kaliumhydrogencarbonat	1 mg/ml

	Natrium-EDTA	0,0375 mg/ml
MACS-Puffer	PBS	
	BSA	2 %
	EDTA	1 mM
Phoshat-Glycerol-Puffer (pH 7.4)	Na ₂ HPO ₄	7 mM
	NaH ₂ PO ₄	3 mM
	Glycerol	2,5 vol%

5.6 Verwendete Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>ATCC Nummer</u>
BaF	HB-283 TM
CHO	CCL-61 TM
COS-7	CRL-1651 TM
J774	TIB-67 TM
RAW	TIB-71 TM

5.7 Verwendete Peptide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Struktur</u>	<u>Hersteller</u>
NG1	FGPNLTGRW-GGG-FAM	Genaxxon

NG2	DLVTSKLQV-GGG-FAM	Genaxxon
NG2	DLVTSKLQV-GKG-FAM	Genaxxon
NGC	KQLSEMVTD-GGG-FAM	Genaxxon

6. Methoden

6.1 Herstellung, Modifizierung und Charakterisierung von Nanoemulsionen

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanoemulsionen wurden zum Teil selbst mittels eines Microfluidizers (M-110P, LV1) vor Ort oder von unserem Kooperationspartner der AG Schubert der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie in Freiburg hergestellt.

Für alle Nanoemulsionen gilt, dass die entsprechenden Lipidmengen abgewogen, in einem Becherglas in Phosphat-Glycerol Puffer aufgenommen und für 30 Minuten auf einem Magnetrührer voremulgiert wurden. Anschließend wurde per Ultraturrax die Emulsion vorhomogenisiert und das Perfluorkarbon (Perfluoro-15-kron-5-ether) hinzugegeben. Nachdem auf die entsprechende Menge mit Phosphat-Glycerol Puffer aufgefüllt worden ist, konnte die Emulsion mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt werden. Dabei wurden die Emulsionen durch 5-10 Zyklen bei 1000 bar homogenisiert.

6.1.1 Herstellung verschiedener PFCs

Für die Herstellung der PFCs wurden folgende Einwaagen verwendet:

Tabelle 6.1: Zusammensetzung der verschiedenen PFCs:

	^{C_n} PFCs	C _n /PEG PFCs	¹⁰⁰ PFCs	¹⁵⁰ PFCs	²⁵⁰ PFCs	^{Mal} PFCs
Perfluoro-15-kron-5-ether	10 %	10 %	20 %	20 %	20 %	20 %
Lipoid S75	35 mM	35 mM	35 mM	17,5 mM	3,5 mM	35 mM
DSPE-PEG-FITC DSPE-PEG-Rho	0,01 mol%	0,01 mol%	0,1 mol%	0,2 mol%	1 mol%	0,01 mol%
DSPE-PEG₂₀₀₀	-	5 mol%	-	-	-	4,5 mol%
DSPE-PEG_{Maleimid}	-	-	-	-	-	0,05 mol%
Phosphat-Glycerol Puffer	auf 50 g	auf 50 g	auf 50 g	auf 50 g	auf 50 g	auf 10 g

6.1.2 Modifikation von Nanoemulsionen

Nach der Herstellung der Nanoemulsionen können diese modifiziert werden. So können Lipide in die Emulsion integriert oder aber auch verschiedene Liganden an reaktive Gruppen gekoppelt werden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen verschiedener Emulsionen beschrieben.

6.1.2.1 PEGylierung von Nanoemulsionen mittels SPIT

Über eine PEGylierung wird die Oberfläche der Partikel verändert, was u.a. die Bindung an Serumproteine unterbindet. PEGylierungen können über DSPE-PEG₂₀₀₀ während der Herstellung der PFCs oder auch über Cholesterol-PEG₂₀₀₀ nach der Herstellung eingebaut werden. Ein Verfahren zur nachträglichen Veränderung der PFCs ist die sog. SPIT = Sterol-basierte post-Insertionstechnik, welche ursprünglich für Liposomen entwickelt wurde. Die SPIT macht sich zu Nutze, dass Cholesterolgruppen spontan in die Lipidschicht der Nanoemulsionen integrieren und sich somit auch in vorgefertigte PFCs integrieren lassen. Durch Verwendung von Cholesterol-PEG₂₀₀₀ kann somit eine PEGylierung von Partikeln durchgeführt werden. Dazu werden standardmäßig 5 mol% Cholesterol-PEG₂₀₀₀ zu der entsprechenden Menge an Emulsion gegeben und diese über Nacht bei 20 °C geschüttelt. Dazu wurde das Cholesterol-PEG₂₀₀₀ in Phosphat-Glycerol Puffer gelöst und dann die entsprechende Menge zur Emulsion hinzugegeben, um über Nacht auf dem Schüttler inkubieren zu können.

6.1.2.2 Integration von GFP in PFCs mittels SPIT

Die SPIT kann auch genutzt werden, um Liganden in die äußere Lipidschicht von PFCs einzubringen.¹²³ Dies wurde durch Kopplung von GFP an ein NHS-PEG₂₀₀₀-Cholesterol und spätere Insertion in die Emulsion ermöglicht. Das NHS reagiert mit primären Aminogruppen, wie sie z. B. in den Lysinresten des GFPs vorhanden sind. Durch Verwendung eines einfachen molaren Überschusses werden statistisch alle GFPs mit einer Cholesterolgruppe versehen. Dazu wird das GFP zusammen mit dem NHS-PEG₂₀₀₀-Cholesterol für eine Stunde bei 20 °C in PBS/EDTA Puffer pH 8.0 inkubiert.

Um die Chol-PEG₂₀₀₀-GFP Komplexe in die Lipidschicht der PFCs zu insertieren, werden die entsprechenden Mengen des Chol-PEG₂₀₀₀-GFP zu der Emulsion gegeben. Vom Cholesterol werden 5 mol% im Verhältnis zum Gesamtgehalt des Lipids in den Emulsionen verwendet und dieses über Nacht bei 20 °C inkubiert. Für die darauffolgende Reinigung der Emulsionen werden diese bei 2000 g für 20 Minuten zentrifugiert und anschließend in PBS/ETDA Puffer pH 8.0 aufgenommen. Dies wird

3x wiederholt und schließlich wird die Emulsion mit Phosphat-Glycerol-Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

6.1.2.3 Kopplung von GFP an ^{Mal}PFCs

Als weitere Kopplungsmöglichkeit wurden Emulsionen mit einer reaktiven Maleimidgruppe verwendet. Dies hat den Vorteil, dass man es während des Herstellungsprozesses in die Emulsion einbringen und bei -80 °C lagern kann. Das Maleimid reagiert mit Sulfhydrylgruppen durch eine Michael-Reaktion. Das GFP wurde im 10-fachen molaren Überschuss zu den vorhandenen Maleimidgruppen auf der Oberfläche der Emulsionen eingesetzt. Da das Maleimid stets in einer Menge von 5 mol% vorliegt, werden 0,5 mol% GFP verwendet. Für die Kopplung des GFP wurde dieses zunächst mithilfe von Trauts Reagenz (2-Iminothiolan) thioliert. Die zyklische Gruppe des Trauts reagiert mit primären Aminogruppen unter Öffnung des Ringsystems und resultiert damit in einer reaktiven Sulfhydrylgruppe. Verwendet wurde Trauts Reagenz in einem 50-fachen molaren Überschuss zum GFP in 5 mM PBS/EDTA, welches anschließend bei 20 °C und 750 rpm für eine Stunde inkubiert wurde. Um überschüssiges Trauts zu entfernen, wurde die Probe über eine mit PBS/EDTA Puffer äquilibrierte 7 kDa Entsalzungssäule aufgereinigt.

Thioliertes GFP wurde zu der entsprechenden Menge ^{Mal}PFCs hinzugegeben und über Nacht bei 20 °C und 750 rpm inkubiert. Die dabei ablaufende Michael-Reaktion sorgt für die Verbindung der freien Sulfhydrylgruppe des GFPs mit der Maleimidgruppe der Emulsionen. Zur Reinigung der Emulsionen werden diese bei 2000 g für 30 Minuten zentrifugiert und anschließend in PBS/EDTA aufgenommen. Dieser Vorgang wird insgesamt 3x wiederholt und schließlich wird die Emulsion mit Phosphat-Glycerol-Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

6.1.2.4 Kopplung von Peptiden an ^{Mal}PFCs

Die Peptide wurden im 5-fachen molaren Überschuss zu den vorhandenen Maleimidgruppen auf der Oberfläche der Emulsionen eingesetzt (60 µg pro ml Emulsion). Da alle eingesetzten Peptide mit einem C-terminalen Cystein ausgestattet sind und dieses eine freie Sulfhydrylgruppe besitzt, können sie direkt an ^{Mal}PFCs gekoppelt werden. Anschließend erfolgt über Nacht bei 20 °C und 750 rpm die Bindung an das Maleimid. Zur Reinigung wurden die Emulsionen in eine 50 kDa Ausschlussäule gegeben und mit PBS/EDTA mehrmals mittels Zentrifugation bei 2.000 g gewaschen. Schließlich wurden die Emulsionen in dem zu Beginn verwendeten Volumen in Phosphat-Glycerol-Puffer aufgenommen.

6.1.3 Charakterisierung von Nanoemulsionen

Nach Herstellung sowie eventueller Modifikation von Nanoemulsionen erfolgt die Charakterisierung der Partikel. Standardmäßig wurden für die in dieser Arbeit verwendeten Nanoemulsionen folgende Charakteristika ermittelt: Größe (Durchmesser), Größenverteilung, ζ -Potenzial, Fluoreszenzintensität sowie Gesamtfluorgehalt.

6.1.3.1 Charakterisierung von Nanoemulsionen mittels PCS

Die Photonenkorrelationsspektroskopie dient der Analyse des hydrodynamischen Durchmessers und der Größenverteilung von kolloiddispersen Systemen. Dabei ist es möglich, Partikelgrößen von 5-5000 nm zu untersuchen. Messprinzip: In die Probe wird monochromatisches Licht spezifischer Wellenlänge eingestrahlt. Dabei kommt es durch den Kontakt mit den Partikeln in der Probe zur Streuung des Lichts. Ein Photomultiplier, welcher im 90° Winkel das Streulicht erfasst, gibt Rückschluss auf die Größe der Partikel. Da alle Teilchen der Brownschen Molekularbewegung unterliegen und diese Bewegung invers mit der Größe korreliert, kann man durch den Zusammenhang des Diffusionskoeffizienten mit der Partikelgröße, gegeben durch die Stokes-Einstein-Gleichung, auf die Größe der Partikel sowie die Größenverteilung (PDI) rückschließen.

Der PDI ist ein dimensionsloser Zahlenwert zwischen 0,0 und 1,0 und beschreibt die Breite der Größenverteilung. Werte $< 0,1$ weisen auf eine monodisperse Verteilung hin. Ein PDI zwischen 0,1 und 0,2 auf eine geringe Dispersität. Ab Werten zwischen 0,2 und 0,5 spricht man von einer breiten Dispersität und bei Werten über 0,5-1 von einer sehr breiten Dispersität.

Für die Messungen wurden die Emulsionen 1:100 in Wasser verdünnt. Gemessen wurden 10 Zyklen a 10 Wiederholungen, woraus der Durchschnittswert der Messung ermittelt wurde. Jede Emulsion wurde 3x gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

Des Weiteren wurde das ζ -Potenzial der Emulsionen bestimmt. Beim ζ -Potenzial handelt es sich vereinfacht um die oberflächliche Ladung von Suspensionspartikeln. Kolloiddisperse Systeme haben in Suspension stets eine fest gebundene Ionenschicht an der Oberfläche, auch als Helmholtz-Doppelschicht bezeichnet. Darum lagern sich lose gebundene Ionen an, so dass die Nettoladung der Partikel gleich Null ist. Bei Bewegung durch ein elektrisches Feld geht ein Teil dieser lose gebundenen Ladung verloren, wodurch nun eine Ladung messbar wird. Werden die Messungen stets im selben Medium vorgenommen, lassen sich so die oberflächlichen Ladungen der verschiedenen Proben miteinander vergleichen.

6.1.3.2 Fluoreszenz- und ^{19}F -Messungen von Nanoemulsionen

Da der Großteil der eingesetzten Nanoemulsionen verschiedene Fluorochrome enthält, sei es durch Einbau während des Herstellungsprozesses oder durch nachfolgende Modifikation, wurden diese ebenfalls im Verhältnis zu der Kontrollemulsion überprüft. Dazu wurden 10 μl der Emulsion auf eine Glasplatte pipettiert und diese in einem IVIS Lumina III gemessen (Anregungszeit: 0,1 sec; binning: medium; F stop: 2; Anregung: 488/533; Emission: GFP/DisRed; Lampenlevel: high; Höhe: 0,5; Verzögerung: 0). Für die Auswertung wurde die MFI verwendet. Für jede Probe wurde ein Dreifachansatz gemessen, aus dem daraufhin ein Mittelwert errechnet wurde.

Die Bestimmung des Fluorgehaltes der Emulsionen erfolgte an einem Bruker 9.4 Tesla AVANCE^{III} WB Spektrometer. Dazu wurden 10 μl der Emulsionen in Eppendorfgefäße pipettiert und zunächst mittels ^1H -Scans eine 2 mm dicke Schicht, welche durch die Mitte der Emulsion geht, gemessen. Anschließend wurde ein korrespondierender ^{19}F -Scan mit 128 Mittelungen durchgeführt: ^{19}F micRARE: TR=2500 ms FOV = 2.56x2.56 cm^2 , matrix: 32x32, Zeit 5 Minuten. In der nachfolgenden Analyse der Messungen wurde das Gesamtfluorsignal bestimmt.

6.1.3.3 Einfluss von freien Radikalen auf das Fluoreszenzsignal

Um die Stabilität der Fluorochrome der Nanoemulsionen unter Einfluss von freien Radikalen zu prüfen, wurde den Emulsionen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zugesetzt. Es wurden 100 μl der jeweiligen Emulsion 10 μl 40 %iger H_2O_2 -Lösung zugesetzt und über einen Zeitraum von 180 Minuten zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 15; 45; 90; 180 Minuten) 10 μl Proben abgenommen. Das Fluoreszenzsignal dieser Probe wurde im IVIS-System gemessen (Anregungszeit: 0,1 sec; binning: medium; F stop: 2; Anregung: 488/533; Emission: GFP/DisRed; Lampenlevel: high; Höhe: 0,5; Verzögerung: 0). Als Fluoreszenz-Hintergrundkontrolle wurde den Emulsionen statt 40 %iger H_2O_2 -Lösung 10 μl H_2O hinzugegeben.

6.1.3.4 Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie

Alle Kryo-TEM-Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie von Sabine Barnert an einem EM Leo 912 Ω -mega (Carl-Zeiss) vorgenommen. Dazu wurden die Proben verdünnt (5-10 mM) und 5 μl dieser Verdünnung auf einem Kupfergrid in Ethan schockgefroren. Das Kupfergrid wird in die Kryo Präparationskammer überführt und fixiert. Anschließend können Bilder mit einer bis zu 300.000-fachen Vergrößerung angefertigt werden.

6.2 Experimente mit kultivierten Zelllinien

Alle Zelllinien wurden zur Kultivierung in 75 cm² Flaschen in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % GlutaMAX in einem Standard-Inkubator bei 37 °C und 10 % CO₂ gehalten. Der Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % gesplittet.

6.2.1 Zelluläre Aufnahme von PFCs

6.2.1.1 Durchflusszytometrie

Um die Aufnahme von PFCs in Zellen zu überprüfen, wurden verschiedene Zelllinien (CHO, J774, RAW) zunächst auf 10 cm Schalen ausplattiert, um sie bis zur Konfluenz wachsen zu lassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem DMEM aufgenommen. Daraufhin wurde jeweils 1 ml DMEM in ein 15 ml Falcon überführt und 10 µl der entsprechenden Emulsion hinzugegeben. Für die Zeitkinetik wurden die Zellen bei 37 bzw. 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zu den beschriebenen Zeitpunkten wurden 100 µl aus der Probe in 2 ml vorgelegtes eiskaltes PBS überführt. Diese wurden bei 500 g für 5 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen erneut in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen. Abschließend konnte die Aufnahme der Nanoemulsion anhand von FACS Messungen überprüft werden. Die FACS Messungen wurden entweder an einem FACS CANTO-II oder einem LSR FORTESSA (Pharmakologie, AG Fischer) vorgenommen. Die Zellkulturzellen wurden mittels FSC und SSC identifiziert. Analysiert wurde je nach verwendeter Emulsion die FITC- oder Rhodamin-MFI. Tote Zellen wurden vorher mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.2.1.2 ¹⁹F-Messungen

Für die ¹⁹F-Messungen wurden die Zellen auf 10 cm Schalen bis zu einer 80 % Konfluenz kultiviert. Daraufhin wurden 10 ml frisches Medium zu den Zellen hinzugefügt sowie 50 µl der entsprechenden Emulsion. Inkubiert wurden die Zellen mit den Emulsionen für 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank auf dem Schüttler. Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt sowie 5x mit PBS gewaschen, um sämtliche überschüssigen Emulsionen zu entfernen. Abgelöst wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde nach zwei unterschiedlichen Methoden verfahren:

Für die PFCs vs. ^{PEG}PFCs Versuche wurden die Zellen in 250 µl PBS aufgenommen und in PCR-Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die PCR-Röhrchen in das MRT überführt und gemessen. Dazu wurde per ¹H-Scan das Zellpellet anhand einer RARE-Sequenz visualisiert. Anschließend wurde ein horizontaler Fluorscan durch das gesamte Pellet gelegt. Parameter des Fluoriscans: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 256.

Für Versuche mit PFCs unterschiedlicher Größe wurden die Zellen in 1 ml DMEM aufgenommen und parallel 2 ml Percoll in einem 15 ml Falcon vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen sehr vorsichtig auf das Percoll geschichtet und daraufhin bei 500 g für 20 Minuten bei geringer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Danach konnte der Dichtegradient vorsichtig in das MRT überführt werden. Die Zellschicht ließ sich anhand eines senkrechten T2-gewichteten RARE-Scans (RARE Faktor = 64) eindeutig identifizieren. Für den Fluorscan wurde eine vertikale 7 mm dicke Schicht durch das Falcon gelegt. Parameter des Fluoriscans: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 512. Ausgewertet wurde bei beiden Methoden der Gesamtfluorgehalt.

6.2.2 Titrationsreihe verschiedener PEGylierungsmengen mittels SPIT

In der Literatur wird für verschiedene Nanopartikel beschrieben, dass eine 5 %ige PEGylierung einen guten Abschirmungseffekt bezüglich der Aufnahme in Immunzellen erzeuge. Da bei der SPIT-Technik nicht bekannt ist, wie viele der Cholesterol-PEG₂₀₀₀ Moleküle in die Lipidschicht insertiert werden, wurde untersucht, in wieweit eine Erhöhung der PEG-Menge zu einer besseren Abschirmung führt. Um die optimale PEG-Menge bestimmen zu können, wurde die Menge an Cholesterol-PEG₂₀₀₀ titriert. Cholesterol-PEG₂₀₀₀ wurde im molaren Verhältnis zur Gesamtmenge des vorhandenen Lipids im prozentualen Verhältnis von 5, 25, 50 und 75 mol% eingesetzt.

Um die zelluläre Aufnahme dieser Emulsionen zu überprüfen, wurden zum einen J774-Zellen verwendet, als auch aus dem Blut isolierte humane Immunzellen. Dazu wurden 5×10^5 Zellen in 1 ml DMEM in einem 15 ml Falcon mit 10 µl der entsprechenden Emulsion bei 37 °C auf dem Schüttler für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Probe in 2 ml eiskaltes PBS überführt, bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und die Probe in 100 µl MACS-Puffer aufgenommen. Analysiert wurden die Proben an einem LSR FORTESSA. Dazu wurde die MFI des Rhodamins bestimmt.

6.2.3 Transfektion von CHO-Zellen

6.2.3.1 Transiente Transfektion von CHO-Zellen

Für transiente Transfektionen der CHO-Zellen wurde zunächst das Medium der 75 cm² Zellkulturflaschen entfernt und daraufhin 1x mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 2,5 ml Trypsin hinzugegeben und die Flasche bei 37 °C für etwa 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Kulturmedium zugeführt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in 2.5 ml Kulturmedium resuspendiert. Je 500 µl der Zellsuspension (ca. $2-2.5 \times 10^6$ CHO-Zellen) wurden in ein 15 ml Falcon überführt.

Bei jedem Transfektionsansatz wurde das PEI-Max etwa 4:1 im Verhältnis µl PEI-Max zu µg Plasmid eingesetzt. Zunächst wurde ein PEIMax-Ansatz 50 µl NaCl (150 mM) mit 6 µg Plasmid-DNA hergestellt und ein DNA-Ansatz mit 26 µl NaCl und 24 µl PEIMax. Beide Lösungen wurden gevortext, woraufhin der PEIMax-Ansatz sich mit dem DNA-Ansatz vermischte. Anschließend wurden die Proben ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die vier Transfektionsansätze (CIR1/CIR2/CIR3/ctrl) zu den 500 µl der Zellsuspension gegeben und bei 37 °C für eine halbe Stunde inkubiert. Danach wurden weitere 10 ml DMEM hinzugegeben und die Zellen bis zur Verwendung für weitere 48–72 h weiter kultiviert.

6.2.3.2 Herstellung von stabilen CIR1-3 transfizierten CHO-Zellen

Um einen stabilen Einbau der Plasmide in das Genom zu gewährleisten, wurde zunächst die gleiche Transfektionsmethode wie in 6.2.3.1 beschrieben durchgeführt. Zur Selektion der CIR-exprimierenden Zellen wurde Genistein (G418: 500 µg/ml) zum Medium hinzugegeben. Anschließend wurde über 2-3 Wochen hinweg selektiert. Daraufhin wurden positive Klone gepickt, in eine 6-Well Schale überführt, und weiter kultiviert. Nach etwa 2 Monaten wurde die Zugabe von G418 beendet. In regelmäßigen Abständen wurde die Expression der CIRs mittels Durchflusszytometermessungen überprüft.

6.2.4 Expression der Cargo-Internalisationsrezeptoren CIR1-3

6.2.4.1 Durchflusszytometrie

Zunächst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 2 ml eines 2,5 mM EDTA/PBS Puffers für ca. 5-10 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 350 g für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in

1 ml frischem DMEM resuspendiert und 1 µg/ml GFP hinzugegeben. Die Ansätze wurden dann entweder bei 4 oder bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Um das überschüssige GFP nach der Inkubation zu entfernen, wurden die Zellen nochmals bei 350 g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Um tote Zellen ausschließen zu können, wurden zudem 1 µg/ml DAPI zu jedem Ansatz hinzugegeben. Analysiert wurden die Proben an einem FACS CANTO II hinsichtlich der GFP Fluoreszenz.

6.2.4.2 Western Blot

Für einen weiteren Transfektionsnachweis wurde ein Western Blot mit transfizierten Zellen durchgeführt. Dieser wurde in Kooperation mit der Biochemie II von Prof. Scheller von Paul Baran durchgeführt. Dazu wurden die Zellen (CIR1, CIR2, CIR3, ctrl) mittels 2,5 mM PBS/EDTA Puffer von der Platte gelöst und bei 350 g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl Lysepuffer aufgenommen und für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 20.000 g wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand als Lysat abgenommen. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 µg des Proteinlysats reduziert und in die Kammer der SDS-PAGE aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran anschließend mit 5 %igem Milchpulver in TBS-T für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des anti-Myc Antikörpers (1:1000) erfolgte über Nacht bei 4 °C in TBS-T mit 5 %igem Milchpulver. Nach 3x Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) in 5 %igem Milchpulver in TBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden mit *Immobilin Western Chemiluminescent HRP substrate* mithilfe eines *ChemoCam Imagers* detektiert.

6.2.5 Zellassays mit den CIR1-3

6.2.5.1 Aufnahmekinetik von GFP in CIR1-3

Für die Aufnahmekinetik des GFP in transfizierte CIR1-3 wurden die Zellen mittels 2,5 mM PBS/EDTA für 30 Minuten bei 37 °C abgelöst, daraufhin in ein 15 ml Falcon überführt und bei 350 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml DMEM aufgenommen. Anschließend wurde 1 µg/ml GFP hinzugegeben und zu den gegebenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 40, 80 Minuten) 100 µl der Probe entnommen und in 2 ml eiskaltes PBS überführt. Die Proben wurden bei 350 g für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend in 200 µl MACS Puffer aufgenommen. Die FACS Messungen wurden an einem FACS CANTO II durchgeführt und die MFI

der Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die toten Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.2.5.2 Aufnahmekinetik von ^{GFP}PFCs in CIR1-3

CHO-CIR-Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA von der Platte gelöst und, nach Entfernen des Trypsins durch Zentrifugation, in frischem Medium aufgenommen. Dann wurde jeweils 1 ml DMEM in ein 15 ml Falcon überführt (ca. 5×10^5 Zellen/ml) und für den Start der Zeitkinetik 10 µl ^{GFP}PFCs hinzugegeben. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C auf dem Schüttler. Zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden jeweils 100 µl Probe in 2 ml eiskaltes PBS überführt, bei 350 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und an einem LSR FORTESSA analysiert. Gemessen wurde sowohl die Fluoreszenz des GFP, als auch die des Rhodamins. Für die Auswertung wurde die MFI verwendet. Die toten Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.2.5.3 Inhibition der ^{GFP}PFC-Aufnahme durch Präinkubation mit GFP

Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen, wie zuvor in 6.2.5.2 beschrieben, vorbereitet und in 1 ml DMEM in Falcons bereitgestellt. Diese wurden dann bei 4 °C für 10 Minuten äquilibriert, anschließend wurden 5 µg/ml GFP hinzugegeben und für weitere 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl ^{GFP}PFCs hinzugegeben und über 80 Minuten hinweg bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zu den spezifischen Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten nach Zugabe der ^{GFP}PFCs) wurden jeweils 100 µl Probe in 2 ml eiskaltes PBS überführt. Die Nullwert-Probe wurde nach der 30-minütigen Inkubation kurz vor Zugabe der ^{GFP}PFCs abgenommen. Die Proben wurden anschließend bei 350 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und ebenfalls an einem LSR FORTESSA analysiert. Gemessen wurde sowohl die Fluoreszenz des GFP, als auch die des Rhodamins. Für die Auswertung wurde die MFI verwendet. Die toten Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.2.5.4 Aufnahme von ^{GFP}PFCs mittels ¹⁹F-Messungen

CHO-Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, transfiziert und daraufhin auf eine 6-Well Platte aufgeteilt. Nach 2 Tagen wurde das alte Medium durch 1 ml frisches DMEM ersetzt und die Platte zunächst bei 4 °C für 30 Minuten äquilibriert und anschließend zu jeweils drei 6-Well 10 µl ^{GFP}PFCs

bzw. PFCs gegeben. Die Inkubation wurde bei 4 °C für 2 Stunden durchgeführt, um ein Binden der Emulsionen an den Rezeptor zu gewährleisten. Anschließend wurde sehr vorsichtig 5x mit vorgekühltem PBS gewaschen, um alle nicht gebundenen Emulsionen zu entfernen. Daraufhin wurde wieder 1 ml DMEM hinzugefügt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C, um die Aufnahme der gebundenen Emulsionen zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Zellen mehrfach gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und in 150 µl PBS in PCR Röhrchen überführt. Später konnten die Zellpellets mittels RARE-Scans im MRT dargestellt werden. Für die Fluoroscans wurde ein horizontaler 2 mm Scan durch das gesamte Zellpellet gelegt und anschließend der Gesamtfluorgehalt bestimmt. Daten des Fluoroscans: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 20.000.

Für die ¹⁹F-Messungen der CIR1-3 stabil transfizierten Zellen wurde jeweils eine ca. 80 %ige konfluente 6 cm Schale verwendet. Bei dieser wurde 10 ml frisches Medium zugegeben und 75 µl der ^{GFP}PFCs hinzugefügt. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank in einer Feuchtkammer auf einem Schüttler. Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und daraufhin 5x mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte über 5 Minuten hinweg mit Hilfe von 2 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und bei 500 g für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml frischem DMEM aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in einem 15 ml Falcon auf 2 ml Percoll geschichtet und bei 500 g für 20 Minuten bei geringster Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Die Probe wurde in das MRT überführt und gemessen. Die Zellschicht läßt sich Anhand eines RARE-Scans identifizieren. Für den Fluorscan wurde eine vertikale 7 mm Schicht durch das Falcon gelegt. Daten des Fluoroscans: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 512.

6.2.5.5 Ko-Kultur zur Ermittlung der Spezifität der ^{GFP}PFCs

Für die Ko-Kultur wurden Immunzellen aus murinem Blut isoliert und zu CIR-exprimierenden Zellen in insgesamt 1 ml DMEM hinzugegeben. Das Verhältnis zwischen Immunzellen und CIRs betrug ca. 1:1. Anschließend wurden 10 µl ^{GFP}PFCs hinzugefügt und die Zellen bei 37 °C für 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert. 100 µl der Probe wurden in 2 ml eiskaltes PBS überführt und bei 350 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und an einem LSR FORTRESSA analysiert. Gemessen wurde sowohl die Fluoreszenz des GFP, als auch die des Rhodamins. Für die Auswertung wurde die MFI verwendet. Die toten Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.2.6 Immunzytochemische Färbungen der CIR1-3

Für immunzytochemische Färbungen der transienten CIRs wurden ca. 1×10^5 Zellen auf runden Objektträgern in einem 6-Well in 2 ml DMEM ausplattiert und über Nacht anwachsen gelassen. Am folgenden Tag wurden die Objektträger in ein frisches 6-Well mit 1 ml DMEM überführt und $1 \mu\text{g/ml}$ GFP hinzugegeben. Daraufhin wurden die Zellen bei 37 bzw. 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und das überschüssige GFP durch 3x Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 %igem PFA für 5 Minuten fixiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurde für 10 Minuten mit $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI in 100 μl MACS-Puffer gefärbt und daraufhin nochmals gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen in Mowiol eingedeckelt und durch konfokale Mikroskopie (Zeiss LSM 710) untersucht.

Bei den stabilen CIRs erfolgte die Inkubation nur bei 37 °C und statt GFP wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 μl der GFP^{PFCs} inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit WGA ($1 \mu\text{g/ml}$) in 100 μl MACS-Puffer für 30 Minuten gefärbt und danach nochmals mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Proben mit DAPI gefärbt und in Mowiol eingedeckelt.

6.3 Versuche mit primär isolierten Immunzellen

Für die Isolation der kompletten Immunzellfraktion wurde das humane Blut in Erythrozytenlysepuffer aufgenommen (1:2) und 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen bei 350 g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaut. Das Pellet wurde erneut in Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Dies wurde so oft wiederholt bis das Pellet frei von Erythrozyten war. Das Pellet wurde daraufhin in DMEM aufgenommen.

Wurde nicht mit der gesamten Immunzellfraktion gearbeitet, sondern nur mit humanen Granulozyten, wurden diese mittels Dichtegradient aufgetrennt. Dazu wurde das Blut 1:2 in PBS verdünnt und in einem 50 ml Falcon zunächst 10 ml Histopaque 1,119 vorgelegt. Darüber wurde vorsichtig eine Schicht aus 10 ml Histopaque 1,077 aufgetragen. Darauf wiederum kam das verdünnte Blut, woraufhin dieses bei 500 g für 20 Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der obere Teil mit den PBMCs abgesaugt und etwa 10 ml oberhalb des Erythrozytenpellets in ein frisches 50 ml Falcon überführt, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 350 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 20 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen gelassen. Anschließend folgte eine letzte Zentrifugation bei 350 g für 10 Minuten, woraufhin das Pellet in DMEM aufgenommen wurde und die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden konnte. Dies wurde durch Verwendung einer konstanten

Flussrate sowie fixen Aufnahmezeit bewerkstelligt. Da bei diesen beiden Parametern das gemessene Volumen bekannt ist, kann so auf die Zellzahl pro μl zurückgerechnet werden.

Für die Isolation der murinen Immunzellen wurde der Maus unter 1,5% Isofluranbetäubung 500 μl Pentobarbital und 150 μl Heparin i.p. gespritzt. Nach etwa 10-15 Minuten konnte die Oberhaut der Maus von caudal nach apikal, und danach die Bauchdecke entlang der *linea alba* geöffnet werden. Die Organe wurden zur Seite geschoben und somit die *vena cava* freigelegt. Dann wurde mittels einer Flügelpunktionskanüle (23 g) das Blut entnommen. Das Blut wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 5 ml Erythrozytenlysepuffer inkubiert und daraufhin bei 350 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Immunzellen wurden, sofern nötig, nochmals in Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. War das Immunzellpellet erythrozytenfrei wurde es in MACS-Puffer aufgenommen.

6.3.1 Aufnahmekinetik von Nanoemulsionen durch murine Immunzellen

Die isolierten murinen Immunzellen wurden in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf 2 15 ml Falcon aufgeteilt. Zu jedem wurden 10 μl der entsprechenden Emulsion hinzupipettiert ($^{\text{Rho}}$ PFCs bzw. $^{\text{Rho/PEG}}$ PFCs) und dann bei 37 oder 4 °C über 80 Minuten hinweg inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden 100 μl Probe in 2 ml eiskaltes PBS überführt und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μl MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen an einem LSR FORTESSA gemessen. Für die Durchflusszytometermessungen wurde standardmäßig folgendes Gatingeschema verwendet:

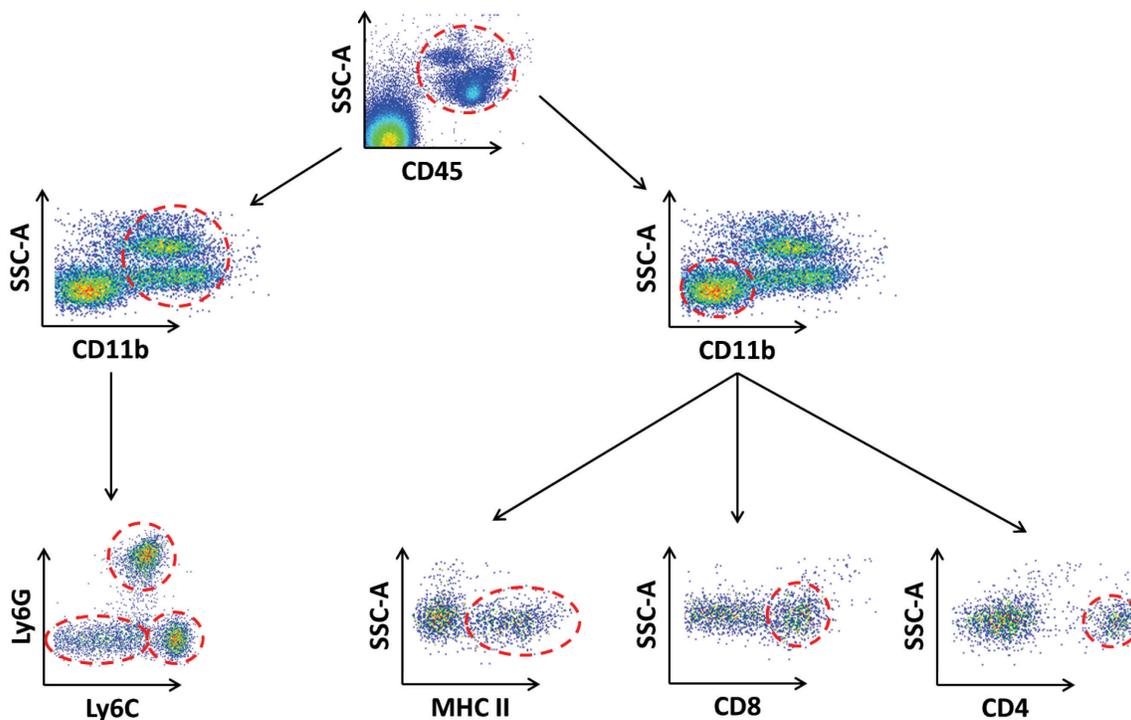


Abbildung 6.1: Schema der Durchflusszytometrie für die Mausversuche.

Murine Immunzellen wurden mittels CD45 identifiziert und durch CD11b in myeloide und lymphoide Zellen unterteilt. Die myeloiden Zellen wurden anhand von Ly6G und Ly6C näher charakterisiert. Die lymphoiden durch Verwendung von MHCII, CD4 und CD8.

Die Immunzellen wurden mithilfe eines CD45-Antikörpers angefärbt. Davon ausgehend wurden zum einen die CD11b⁺ ausgewählt und diese durch Verwendung von Ly6G und Ly6C in neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺) sowie reparativen (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁺) und inflammatorischen (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁺⁺) Monozyten unterteilt. Zum anderen konnte durch Auswählen der CD11b⁻ Population unter Verwendung eines MHCII sowie CD4 und CD8 Antikörpers, auf die B-Zellen (CD45⁺, CD11b⁻, MHCII⁺), die T-Helferzellen (CD45⁺, CD11b⁻, CD4⁺) sowie die cytotoxischen T-Zellen (CD45⁺, CD11b⁻, CD8⁺) geschlossen werden.

6.3.2 Peptid Assays

6.3.2.1 Funktionalitätstest von Peptiden auf Immunzellen verschiedener Spezies

Die zelluläre Bindung verschiedener Peptide (NG1, NG2, NGC) wurde an Immunzellen verschiedener Spezies überprüft. Alle verwendeten Blutproben wurden mit Erythrozytenlysepuffer inkubiert, um so

die Immunzellen zu isolieren. Anschließend wurden ca. 1×10^5 Zellen in einem 96-Well ausplattiert und $1 \mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Peptids hinzupipettiert. Inkubiert wurden die Zellen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank für 30 Minuten. Die Proben wurden 2x mit PBS gewaschen und an einem FACS CANTO II hinsichtlich ihrer FITC-Fluoreszenz analysiert. Immunzellen wurden anhand passender FSC/SSC-Einstellungen identifiziert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung ($1 \mu\text{g/ml}$) von der Analyse ausgeschlossen.

6.3.2.2 Bindungskapazität von NG2 an Granulozyten von Gesunden und nach MI

Beim Vergleich der Bindung des Peptides an Blutproben Gesunder und Proben von Patienten nach einem Myokardinfarkt wurden die Granulozyten mittels Dichtegradient isoliert. Anschließend wurden 1×10^5 Granulozyten in ein 96-Well überführt und mit den Peptiden ($1 \mu\text{g/ml}$) für 30 Minuten bei 4 bzw. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Dies wurde stets als Dreifachansatz durchgeführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Proben hinsichtlich ihrer MFI und Anzahl positiver Zellen für das Peptid an einem FACS CANTO II analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung ($1 \mu\text{g/ml}$) ausgeschlossen.

6.3.2.3 Peptidbindung nach Aktivierung durch LPS

Um den Unterschied in der Bindungskapazität vor und nach Aktivierung zu überprüfen, wurden 1×10^6 isolierte Immunzellen in 1 ml DMEM mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne LPS inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3x gewaschen und in ein 96-Well überführt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit den Peptiden ($1 \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die MFI an einem FACS CANTO II bestimmt. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung ($1 \mu\text{g/ml}$) ausgeschlossen.

6.3.2.4 Internalisierungsnachweis von NG2 mittels Kopplung an pH-Rodo

Um die Internalisierung des NG2-Peptides nachzuweisen, wurde das Peptid an pH-Rodo gekoppelt. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft in saurem Milieu stärker zu fluoreszieren und dient daher als Nachweis für eine Aufnahme in saure Lysosome. Verwendet wurde pH-Rodo mit einer Maleimidgruppe, welches über das freie Cystein in den Peptiden an diese gekoppelt werden konnte. Beide wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 verwendet. Dazu wurden $100 \mu\text{g}$ des NG2 mit $55 \mu\text{g}$ des pH-Rodos über Nacht bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Schüttler inkubiert. Es wurden 5×10^5 Granulozyten in 5 ml DMEM zunächst 30 Minuten bei 4 und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert und anschließend $5 \mu\text{l}$ des

hergestellten NG2-pH-Rodo hinzugegeben. Nach 20, 40 und 60 Minuten wurde jeweils eine 100 μ l Probe in 2 ml eiskaltes PBS überführt, gewaschen und anschließend in 100 μ l MACS Puffer mit 1 μ g/ml DAPI aufgenommen. Quantifiziert wurde die FITC- und Rhodaminfluoreszenz an einem LSR FORTESSA.

6.3.2.5 Identifikation des Bindeparters von NG2

Die Identifikation des Bindeparters von NG2 wurde in Kooperation mit der Firma DualsystemsBiotech durchgeführt. Diese haben mit dem *ligand-receptor-capturing* eine Methode entwickelt, unbekannte Bindeparter auf Zellen zu identifizieren. Die Methode beruht auf dem *TriCeps*TM, welches aus drei unterschiedlichen funktionellen Gruppen besteht. Zum einen ein NHS zur Kopplung des Liganden an das *TriCeps*TM. Weiterhin besitzt es für eine verstärkte Bindung an das Zielprotein eine Hydrazidgruppe. Für die spätere Aufreinigung ist zudem eine Biotingruppe enthalten. Für den Versuch wurden zwei unterschiedliche NG2-Peptide verwendet. Zum einen das standardmäßig in dieser Arbeit verwendete NG2-Peptid mit einem GGG-Spacer, zum anderen ein Peptid mit einem GKG-Spacer. Das zusätzliche Lysin wurde für eine weitere primäre Aminogruppe eingebaut, um die Kopplungseffizienz an das *TriCeps*TM zu erhöhen. Als Negativkontrolle wurde Transferrin an das *TriCeps*TM gekoppelt. Die Kopplung sowie die darauf folgende Inkubation mit den Zellen erfolgte nach Herstellerangaben.

6.3.3 ^{NG2}PFCs Assays

6.3.3.1 Aufnahmekinetik von ^{NG2}PFCs durch humane Immunzellen

Um die Aufnahme der ^{NG2}PFCs in humane Granulozyten zu untersuchen, wurden isolierte humane Immunzellen verwendet und diese in DMEM aufgenommen. Danach wurde jeweils 1 ml (ca 1×10^6 Zellen) in ein 15 ml Falcon überführt und 10 μ l der entsprechenden Emulsion hinzupipettiert. Nach spezifischen Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurde 100 μ l der Probe abgenommen und in 2 ml eiskaltes PBS überführt. Dieses wurde bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 200 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Proben hinsichtlich ihrer Rhodaminfluoreszenz an einem LSR FORTESSA analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 μ g/ml) ausgeschlossen.

6.3.3.2 Inhibition der Aufnahme durch NG2-Präinkubation

Für den Inhibitionsassay wurden die Proben, wie in 6.3.3.1 beschrieben, vorbereitet. Die in 15 ml Falcon überführten Immunzellen wurden bei 4 °C äquilibriert, 15 Minuten später wurden 5 µg/ml NG2 hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der ^{NG2}PFCs beigefügt und die Proben bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden 100 µl der Probe entnommen und in 2 ml eiskaltes PBS überführt. Diese wurde bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Proben hinsichtlich ihrer Rhodaminfluoreszenz an einem LSR FORTESSA analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.3.3.3 Aufnahmenachweis von ^{NG2}PFCs mittels ¹⁹F Messungen

Für die ¹⁹F-Messungen der Granulozyten wurden aus jeweils 10 ml Blut die Immunzellen mittels Erythrozytenlyse gewonnen und in 10 ml DMEM aufgenommen. Dann wurden 75 µl der ^{NG2}PFCs bzw. ^{NGC}PFCs hinzupipettiert und über Nacht für ca. 15 Stunden bei 37 °C auf einer 6 cm Schale auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Immunzellen vorsichtig in ein 15 ml Falcon überführt und bei 500 g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Dies wurde insgesamt 5x wiederholt. Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und vorsichtig auf 2 ml Percoll in einem 15 ml Falcon geschichtet. Daraufhin wurden die Zellen bei 500 g für 20 Minuten bei nicht vorhandener Beschleunigung und Bremse zentrifugiert und das Falcon danach in das MRT überführt und gemessen. Des Weiteren wurden gesunde Proben und Proben nach Myokardinfarkt mittels ¹⁹F Bildgebung verglichen. Dazu wurden die Granulozyten mittels Dichtezentrifugation isoliert und anschließend 5x10⁶ Granulozyten für die Versuche verwendet. Inkubiert wurden die Proben für 5 Stunden mit 10 µl/ml ^{NG2}PFCs bzw. ^{NGC}PFCs bei 37 °C auf dem Schüttler. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend 5x mit 5 ml PBS gewaschen. Final wurden die Zellen auf einen Percoll geschichtet und nach 20-minütiger Zentrifugation bei 500 g in das MRT überführt und gemessen. Die Zellschicht läßt sich anhand eines RARE-Scans eindeutig identifizieren. Für den Fluoriscan wurde eine vertikale 7 mm Schicht durch das Falcon gelegt. Daten des Fluoriscans: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 512. Ausgewertet wurde der Gesamtfluorgehalt oder das SNR.

6.3.3.4 ROS-Assay nach Inkubation mit ^{NG2}PFCs

Für den ROS-Assay wurden ca. 1×10^7 isolierte humane Immunzellen in einem 15 ml Falcon verwendet und 1 $\mu\text{g/ml}$ Peptid bzw. 10 $\mu\text{l/ml}$ Emulsion hinzupipettiert. Nach 1, 3, 6 und 24 Stunden wurden 500 μl abgenommen und bei 350 g für 10 Minuten runterzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für eine spätere Analyse eingefroren. Die Messungen der ROS-Menge wurden in Kooperation mit Prof. Engel in Essen vorgenommen.

6.3.3.5 Messung von Aktivitätsmarkern nach ^{NG2}PFC-Inkubation

Zusätzlich zum ROS-Assay wurden verschiedene Aktivitätsmarker gemessen. Dazu wurden 1×10^6 Granulozyten für 1 Stunde in 1 ml DMEM mit 10 μl ^{NG2}PFCs inkubiert bzw. nur in DMEM. Als Positivkontrolle wurden die Zellen in 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS in 1 ml DMEM für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit 1 ml PBS gewaschen und jeweils 1×10^5 in 96-Wellen überführt. Dann folgte eine 30-minütige Färbung mit CD11b (1:100), CD63 (1:100) und CD66b (1:100) bei $4\text{ }^\circ\text{C}$. Nach erneutem Waschen wurde die MFI gemessen und mit der Negativkontrolle verglichen.

6.3.3.6 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden nach Messung der Aufnahmekinetik mit der restlichen Probe durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf einen Poly-L-Lysin-Objektträger pipettiert, welcher vorher mit Nagellack umrandet wurde. Dann wurden die Zellen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ etwa 1 Stunde lang gelagert, bis sich die Zellen abgesetzt hatten. Die Probe wurde 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 4 %igem PFA fixiert. Daraufhin wurde nochmals mit PBS gewaschen und mit DAPI (1 $\mu\text{l/ml}$) in MACS-Puffer für 20 Minuten im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Proben mit Mowiol eingedeckelt und bis zur Analyse an einem *Laser Scanning Microscope* bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

6.3.4 Vergleich der Endozytose von gesunden und Infarktpatienten

Um die Phagozytosekapazität der Granulozyten von Gesunden und Patienten nach einem Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt. Für den einen wurde ein standardmäßig eingesetzter Phagozytoseassay verwendet, welcher über die Aufnahme von Dextranpartikeln gemessen wird. Für den anderen wurden ^{Cfl}PFCs verwendet.

6.3.4.1 Endozytosemessung mittels Dextranpartikel

Um die Endozytosekapazität neutrophiler Granulozyten zu ermitteln, wurden diese mit pH Rodo-konjugierten Dextranpartikeln inkubiert. Diese besitzen die Eigenschaft mit sinkendem pH stärker zu fluoreszieren und können daher als Nachweis für eine Aufnahme in endosomale oder lysosomale Strukturen dienen. Für den Assay wurden 1×10^6 isolierte Granulozyten mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Dextranpartikeln resuspendiert. Inkubiert wurden die Proben bei 37 °C auf dem Schüttler. Zu den spezifischen Zeitpunkten (0; 10; 20; 30 Minuten) wurden 100 μl Proben abgenommen und in eiskaltes PBS überführt. Nach 2x Waschen wurden die Proben in 200 μl MACS-Puffer mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI resuspendiert und an einem FACS CANTO II bezüglich ihrer Dextranpartikelaufnahme analysiert.

6.3.4.2 Endozytosemessung mittels PFCs

Der Endozytoseassay mit den $^{\text{Cf}}$ PFCs wurde mit 1×10^6 isolierten Granulozyten durchgeführt. Diese wurden in 1 ml DMEM resuspendiert, woraufhin 10 μl der $^{\text{Cf}}$ PFCs hinzugegeben wurde. Inkubiert wurden die Proben über 80 Minuten hinweg bei 37 °C auf dem Schüttler. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden 50 μl Proben abgenommen und in eiskaltes PBS überführt. Nach 2x Waschen wurden die Zellen in 200 μl MACS-Puffer mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI aufgenommen und die Aufnahme der Partikel an einem FACS CANTO II bestimmt.

6.3.5 Migrationsuntersuchungen

6.3.5.1 Migrationsassay von humanen Granulozyten

Um die migratorischen Eigenschaften von Granulozyten Gesunder und Infarktpatienten zu vergleichen, wurde ein standardisierter Migrationsassay durchgeführt. Verwendet wurden dazu die ThinCert™ Einsätze von Greiner Bio One für 24-Well Platten mit einer Porengröße von 3 μm . Es wurden jeweils 100.000 frisch isolierte Granulozyten in 200 μl DMEM in die obere Kammer pipettiert und in der unteren Chemokine in verschiedenen Verdünnungsgraden getestet. Verwendet wurde IL-8 (10, 50 und 100 ng/ml) in 350 μl DMEM bzw. als Negativkontrolle Medium ohne Chemokin. Die Platten wurden für 1 bzw. 3 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, anschließend wurde das Medium aus dem 24-Well in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 350 g für 5 Minuten zentrifugiert und in 200 μl MACS-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durchflusszytometrisch, indem bei konstanter Flussrate 30 Sekunden lang akquiriert und daraus die Gesamtzahl an Granulozyten berechnet wurde.

6.3.5.2 Einfluss von ^{NG2}PFCs auf die Migration von neutrophilen Granulozyten

Um die Aufnahme der ^{NG2}PFCs auf zentrale Funktionseigenschaften der neutrophilen Granulozyten zu überprüfen, wurde nachfolgend die Migration der Zellen untersucht. Dazu wurden 1×10^5 und 1×10^6 isolierte Granulozyten für 1 Stunde bei 37 °C mit $10 \mu\text{l}$ ^{NG2}PFCs inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Als Kontrolle wurden Zellen ohne ^{NG2}PFCs inkubiert. Danach wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ DMEM in die ThinCert™ Migrationskammern überführt und als Chemokin 100 ng/ml IL-8 in $350 \mu\text{l}$ in der unteren Kammer verwendet. Die Zellen wurden daraufhin für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der untere Teil der Kammerflüssigkeit abgenommen und die Zahl der migrierten Granulozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

6.3.5.3 CXCR1 und CXCR2 Expression auf neutrophilen Granulozyten

Zentrale Rezeptoren für IL-8 sind CXCR1 und CXCR2. Daher wurde die Oberflächenexpression dieser beiden Rezeptoren auf Granulozyten gesunder Donoren und Patienten nach einem STEMI bestimmt. Dazu wurden 1×10^5 isolierte Granulozyten in ein 96-Well überführt und mit CXCR1 bzw. CXCR2 (beide 1:100) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit $200 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gewaschen und final in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer aufgenommen. Die Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch an einem FACS CANTO II bestimmt. Tote Zellen wurden anhand von DAPI ($1 \mu\text{g/ml}$) ausgeschlossen.

6.3.5.4 ELISA von ERK1/ERK2

Um die CXCR1 und CXCR2 nachgeschaltete Signalkaskade in neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde ein ELISA (*enzyme linked immunosorbend assay*) gegen phosphoryliertes ERK1 und ERK2 durchgeführt. Verwendet wurde dafür das ELISA Kit von Invitrogen ThermoFisher Scientific. Es wurde nach den Herstellerangaben im Kit verfahren. Verwendet wurde das Zellpellet von 1×10^6 Granulozyten, welches in $150 \mu\text{l}$ Zelllysepuffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis gelagert wurde. Nach anschließender Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurde der Überstand für den ELISA verwendet. Es wurden sowohl Proben von gesunden als auch von Patienten nach einem Myokardinfarkt untersucht.

6.4 Tierversuche in der Maus

6.4.1 Auswaschkinetik von Nanoemulsionen über 24 Stunden aus Blut, Leber und Milz

Für die Auswaschkinetik wurden männliche C57BL/6 Mäuse (25–30 Gramm; 12–14 Wochen) mittels 1,5 % Isofluran narkotisiert und auf einer Wärmeplatte bei 37 °C gelagert. Für die intravenöse Injektion wurde der Schwanz einige Minuten angewärmt, woraufhin 250 µl der ¹⁰⁰PFCs, ¹⁵⁰PFCs bzw. ²⁵⁰PFCs injiziert wurden. Dann wurde zu entsprechenden Zeitpunkten (1; 3; 6; 24 Stunden) das Fluorsignal im Blut, in der Leber sowie in der Milz gemessen. Dazu wurde die Maus wieder mittels 1,5 % Isofluran narkotisiert und in den Probenkopf überführt. Die Maus wurde so im Probenkopf arrangiert, dass sowohl die Leber als auch die Milz im Messbereich lagen. Orientiert wurde sich an RARE- bzw. für die Blutmessungen an FLASH-Scans. Für die Leber- und Milz-Messungen wurden horizontale Schnitte von caudal nach apikal von der untersten Niere bis etwa zur Lunge gelegt. Für die Blutmessung wurde ein FLASH-Scan, bestehend aus 5 Schichten, oberhalb der linken Niere über die *vena cava* gelegt. Für die Fluormessungen wurden ortskorrespondierende Scans verwendet. Daten der Fluorsscans für Milz und Leber: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 128. Daten der Fluorsscans für Blut: 32x32 Matrix, TR 25 ms, Mittelungen 375. Ausgewertet wurde der Gesamtfluorgehalt.

6.4.2 Matrigel als mildes Inflammationsmodell

Das Matrigelmodell dient als Inflammationsmodell und wurde ebenfalls an männlichen C57BL/6 durchgeführt. Dazu wurde Matrigel bei 4 °C langsam aufgetaut und mit 1 µg/µl LPS versetzt. Für die Implantation des Matrigels wurde die Maus mittels 1,5 % Isofluran narkotisiert und auf einer Wärmeplatte arrangiert. Das Nackenfell wurde abrasiert und 50 µl Matrigel subcutan in den Nacken injiziert. Bis zum Aufwachen wurde die Maus unter einer Wärmelampe gehalten.

6.4.2.1 Akkumulierung von Nanoemulsionen im Matrigel

Die Akkumulation von Nanoemulsionen im Matrigel wurde jeweils 24 Stunden nach dem Injizieren gemessen. Die Injektion der Emulsionen sowie das Arrangieren der Maus im Probenkopf wurde wie in 6.4.1 beschrieben durchgeführt. Das Matrigel konnte anhand von RARE-Sequenzen je nach Verteilung *in vivo* in 5–9 Schichten deutlich sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde ein ortskorrespondierender Fluorscan durchgeführt. Daten des Fluorscan: 32x32 Matrix, TR 2500 ms, Mittelungen 512. Ausgewertet wurde der Gesamtfluorgehalt.

6.4.2.2 Durchflusszytometrische Messungen der isolierten Zellen aus dem Matrigel

Für eine nachfolgende detaillierte Untersuchung wurde das Matrigel aus der Maus herauspräpariert. Dazu wurde die Maus mittels cervikaler Dislokation getötet und anschließend das freipräparierte Matrigel für 30 Minuten in Collagenase-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde über ein 40 µm Zellfilter gegeben und 3x mit 1 ml PBS gewaschen. Parallel wurde ein Mastermix für die Färbung der Zellen angesetzt. Gefärbt wurde gegen CD45, CD11b sowie Ly6G. Nach Zentrifugieren der Probe bei 500 g für 5 Minuten wurde diese in 200 µl MACS Puffer aufgenommen und jeweils 100 µl davon in ein 96-Well überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wurde die eine Probe als Kontrolle in 100 µl MACS-Puffer, die Andere in 100 µl Mastermix aufgenommen. Gefärbt wurde für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank. Final wurden die Proben 2x gewaschen und an einem LSR FORTRESSA analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.4.2.3 Isolation der Zellen aus dem Matrigel und anschließende *ex vivo* Inkubation

Für die *ex vivo* Messungen der migrierten Zellen wurde das Matrigel wie beschrieben implantiert und 24 Stunden später die Zellen aus dem Matrigel über einen Collagenaseverlauf isoliert. Die isolierten Immunzellen wurden in 3 ml DMEM aufgenommen und daraufhin zu je 1 ml in 15 ml Falcon aufgeteilt. Anschließend wurden 10 µl der entsprechenden Emulsion hinzugefügt und diese bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 40, 80 Minuten) wurden 50 µl Probe entnommen und in 2 ml eiskaltes PBS überführt. Die Proben wurden 2x gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C gegen CD45 (1:400) und CD11b (1:400) gefärbt. Nach erneutem 2x Waschen wurden die Proben an einem LSR FORTRESSA auf ihre Rhodaminfluoreszenz hin analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.4.2.4 *In vivo* Detektion von BaF-CIR-Zellen innerhalb eines Matrigel

Für die *in vivo* Detektion der stabil exprimierenden BaF-CIR2 und BaF-CIR3 Zellen wurde das Matrigel wie in 6.4.2 beschrieben implantiert. Zusätzlich zum LPS wurden dem Matrigel 5×10^6 BaF-CIR2 bzw. BaF-CIR3 Zellen zugefügt und in den Nacken implantiert. Anschließend wurden 100 µl der GFP⁺PFCs über die Schwanzvene injiziert und 24 Stunden später wurde das Fluorsignal, wie in 6.4.2.1 beschrieben, gemessen. Daten des Fluorscan: FOV: 2,56 x 2,56 cm²; matrix 64 x 64; 9 Schichten; 1 mm Schichtdicke; 256 Mittelungen.

6.4.3 Aufnahme von PFCs unterschiedlicher Größe durch murine Immunzellen *in vivo*

Für die Aufnahme der PFCs unterschiedlicher Größe wurden erneut männliche C57BL/6 Mäuse (25–30 Gramm; 12–14 Wochen) wie oben beschrieben narkotisiert und auf einer Wärmeplatte bei 37 °C gelagert. Für die intravenöse Injektion wurde der Schwanz einige Minuten angewärmt, woraufhin 250 µl der PFCs injiziert wurden. Nach 1 Stunde wurde sowohl Heparin als auch Pentobarbital i. p. verabreicht. Nach etwa 10–15 Minuten konnte die Oberhaut der Maus von caudal nach apikal und danach die Bauchdecke entlang der *linea alba* geöffnet werden. Die Organe wurden zur Seite geschoben und somit die *vena cava* freigelegt. Dann wurde mittels einer Flügelpunktionskanüle (23g) das Blut entnommen, in 5 ml Erythrozytenlysepuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei 350 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Immunzellen wurden gegebenenfalls nochmals in Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Immunzellpopulationen wurde sowohl CD45 (1:400) als auch CD11b (1:400) für 20 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank gefärbt. Nach 2x Waschen wurden die Zellen an einem LSR FORTESSA hinsichtlich ihrer Rhodaminfluoreszenz analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µg/ml) ausgeschlossen.

6.5 Statistische Auswertung

Alle Auswertungen statistischer Art sowie Darstellung der Graphen wurden mit Origin 8.6 durchgeführt.

7. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein aktives Targeting von Immunzellpopulationen mittels nicht invasiver ^{19}F -Magnetresonanztomographie (^{19}F -MRT) zu realisieren. Dazu sollten Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) derart modifiziert werden, dass diese gezielt Immunzellen ansteuern und von diesen aufgenommen werden, so dass anschließend diese Zellpopulation durch ^{19}F -MRT hochspezifisch visualisiert werden kann.

Da herkömmliche PFCs von Monozyten und Makrophagen sehr effizient aufgenommen werden, musste zunächst diese Art der Aufnahme unterbunden werden, um anschließend ein spezifisches Targeting bestimmter Zellen zu ermöglichen. Neben der Oberflächenbeschaffenheit übt auch die Größe der Partikel einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Aufnahme aus. Daher wurde im ersten Teil der Arbeit der Effekt einer PEGylierung der Partikeloberfläche sowie der Größe der PFCs auf die zelluläre Aufnahme *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein aktives Targeting humaner neutrophiler Granulozyten anhand von Ligandenkopplung an PFCs entwickelt sowie überprüft, ob sich dieses System für ein Tracking von neutrophilen Granulozyten nach einem Myokardinfarkt eignet. Des Weiteren wurde ein künstliches Targeting-System aufgebaut, welches auf einem GFP-gesteuerten Cargo-Internalisierungs-RezeptorSystem basiert. Dies soll ein spezifisches Targeting unterschiedlichster Zellen ermöglichen sowie das Ansteuern von Zellen, die keine starke endozytotische Aktivität besitzen.

7.1 Einfluss von Größe und Oberflächenbeschaffenheit auf die zelluläre Aufnahme von PFCs

7.1.1 PEGylierung der PFC-Oberfläche

In der Literatur ist die PEGylierung als eines der Standardverfahren beschrieben, um Partikeln einen so genannten „*stealth-effect*“ zu verleihen.¹²⁴ Dabei handelt es sich um das Abschirmen der Partikel vor phagozytotisch aktiven Zellen, insbesondere den Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die PEGylierung ist für viele Moleküle und Nanopartikel intensiv untersucht worden, allerdings gibt es bisher keine systematische Untersuchung über den Effekt einer PEGylierung von PFCs auf die zelluläre Aufnahme.^{103,124–127} Dazu erfolgte zunächst die Herstellung und Charakterisierung Fluoreszenz-markierter PFCs mit und ohne PEGylierung. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Carboxyfluorescein (Cfl) und/oder Rhodamin (Rho) eingesetzt.

7.1.1.1 Charakterisierung von PFCs und ^{PEG}PFCs

Nach Herstellung von ^{Cⁿ}PFCs und ^{Cⁿ/PEG}PFCs (siehe 6.1.1 Herstellung verschiedener PFCs) wurden diese zunächst hinsichtlich Größe, Größenverteilung, ζ-Potenzial, Fluoreszenz und ¹⁹F-Gehalt charakterisiert: Zum einen wurde per Photonen-Korrelations-Spektroskopie die Größe in Nanometer, die Größenverteilung der Partikel (Polydispersionsindex, PDI) sowie das ζ-Potenzial bestimmt (siehe 6.1.3 Charakterisierung von Nanoemulsionen). Dabei zeigten sich zwischen beiden Emulsionen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7.1, obere Reihe). Wie zu erwarten, waren ^{Cⁿ}PFCs kleiner und zeichneten sich durch ein etwas niedrigeres ζ-Potenzial aus als ^{Cⁿ/PEG}PFCs. Des Weiteren wurde die mittlere Fluoreszenzintensität sowie der ¹⁹F-Gehalt miteinander verglichen (Abb. 7.1, obere Reihe). Während der ¹⁹F-Gehalt beider Emulsionen sehr ähnlich war, wiesen ^{Cⁿ/PEG}PFCs gegenüber den ^{Cⁿ}PFCs eine verringerte Fluoreszenz auf.

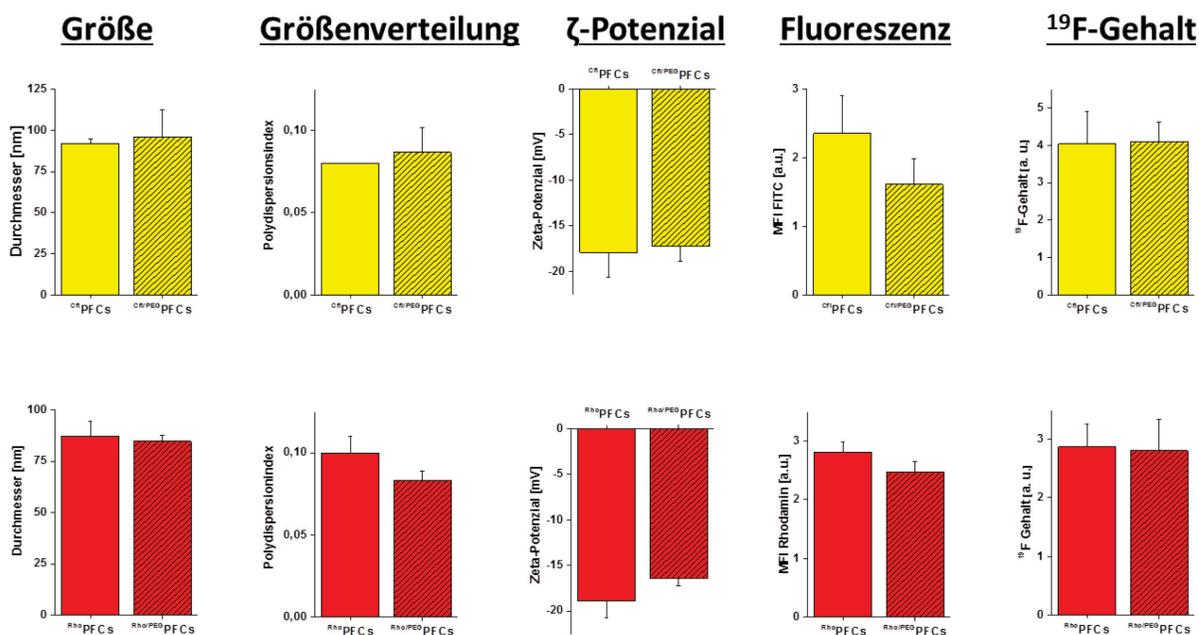


Abbildung 7.1: Charakterisierung der PFCs und ^{PEG}PFCs.

In der oberen Reihe sind von links nach rechts die von den ^{Cⁿ}PFCs mittels PCS-Messung ermittelte Größe (^{Cⁿ}PFCs: 92 ± 2,5 nm; ^{Cⁿ/PEG}PFCs: 95,9 ± 16,4 nm), Größenverteilung (^{Cⁿ}PFCs: 0,08 ± 0; ^{Cⁿ/PEG}PFCs: 0,087 ± 0,015) sowie das ζ-Potenzial (^{Cⁿ}PFCs: -17,91 ± 2,7 mV; ^{Cⁿ/PEG}PFCs: -17,27 ± 1,6 mV) gezeigt. Desweiteren sind die ermittelte Fluoreszenz (^{Cⁿ}PFCs: 2,35 ± 0,55; ^{Cⁿ/PEG}PFCs: 1,61 ± 0,37) sowie der Gesamtfluorgehalt (^{Cⁿ}PFCs: 4,04 ± 0,85; ^{Cⁿ/PEG}PFCs: 4,1 ± 0,53) dargestellt. In der unteren Reihe sind von links nach rechts die von den ^{Rho}PFCs mittels PCS-Messung ermittelte Größe (^{Rho}PFCs: 87,3 ± 7,3 nm; ^{Rho/PEG}PFCs: 84,6 ± 2,8 nm), Größenverteilung (^{Rho}PFCs: 0,1 ± 0,01; ^{Rho/PEG}PFCs: 0,083 ± 0,006) sowie das ζ-Potenzial (^{Rho}PFCs: -18,9 ± 1,86 mV; ^{Rho/PEG}PFCs: -16,44 ± 0,8 mV), die Fluoreszenz (^{Rho}PFCs: 2,8 ± 0,17; ^{Rho/PEG}PFCs: 2,47 ± 0,18) sowie der Gesamtfluorgehalt (^{Rho}PFCs: 2,87 ± 0,4; ^{Rho/PEG}PFCs: 2,8 ± 0,54) dargestellt. n=3 ± SD für alle Messungen.

In nachfolgenden Versuchen wurden die von unseren Kooperationspartnern in Freiburg hergestellten RhoPFCs und Rho/PEGPFCs analysiert. Auch diese wurden zunächst mittels Photon-Korrelations-Spektroskopie hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften untersucht. Weder bei Größe, noch bei Größenverteilung oder ζ -Potenzial konnten signifikante Unterschiede zwischen RhoPFCs und Rho/PEGPFCs festgestellt werden. Die RhoPFCs waren etwas größer als die Rho/PEGPFCs und der PDI fiel etwas höher aus. Beim ζ -Potenzial ergab sich ein etwas niedrigerer Wert bei den RhoPFCs . Auch bei der Messung der Fluoreszenz sowie der Messung des Gesamtfluorgehaltes ließen sich nur geringfügige Unterschiede ausmachen. Die Fluoreszenz war bei den RhoPFCs gegenüber den Rho/PEGPFCs nur minimal stärker. Das Gleiche gilt für den Gesamtfluorgehalt (Abb. 7.1, untere Reihe).

Um auszuschließen, dass vorhandene leere Liposomen die Ergebnisse der Photon-Korrelations-Spektroskopie verfälschen, wurden zusätzlich Kryo-TEM-Aufnahmen (Kryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie) von den RhoPFCs in Kooperation mit der Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie in Freiburg von Wolfgang Krämer durchgeführt (siehe 6.1.3.4 Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie). Da sich hier die PFCs visuell klar von leeren Liposomen unterscheiden lassen (Liposomen hellgrau, PFCs dunkelgrau), läßt sich anhand der Kryo-TEM-Aufnahmen leicht der Liposomenanteil der Emulsion bestimmen. Wie in Abbildung 7.2 zu sehen, ist sowohl bei den RhoPFCs als auch bei den Rho/PEGPFCs nur ein sehr geringer Anteil an Liposomen zu erkennen (Abb. 7.2, unten; roter Pfeil).

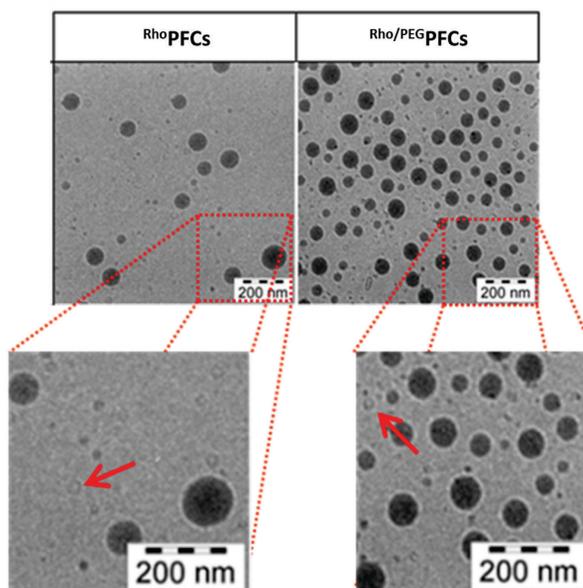


Abbildung 7.2: Kryo-TEM Aufnahmen von RhoPFCs und Rho/PEGPFCs .

Kryo-TEM (Kryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie) Aufnahmen der RhoPFCs und Rho/PEGPFCs . Diese zeigen nur einen geringen Anteil an Liposomen (rote Pfeile), sowohl bei den RhoPFCs als auch bei den Rho/PEGPFCs (Aufnahmen von W. Krämer, Freiburg).

7.1.1.2 Der Effekt einer PFC-PEGylierung auf deren Aufnahme durch kultivierte Zelllinien

Im nächsten Schritt wurde in verschiedenen Zellkulturlinien untersucht, inwieweit die PEGylierung der PFCs Einfluß auf die Aufnahme durch phagozytierende Zellen *in vitro* hat. Hierzu wurden eine Fibroblastenzelllinie (CHO; als nichtphagozytosekompetente Kontrollzelllinie) sowie zwei unterschiedliche Makrophagenlinien (RAW264.7, J774.2) für 24 Stunden mit den verschiedenen Emulsionen inkubiert (siehe 6.2.1). Diese Experimente wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um zwischen passiver Adhäsion (4 °C) und aktiver, energieabhängiger Phagozytose (37 °C) unterscheiden zu können. Anschließend wurde zu bestimmten Zeitpunkten die Aufnahme der Emulsionspartikel durchflusszytometrisch untersucht. Um zu überprüfen, ob die zelluläre Aufnahme der PFCs auch von der Konzentration abhängig ist, wurden die Zellen einer geringen (10 µl/ml) und einer hohen Konzentration (125 µl/ml) ausgesetzt.

Wie vorauszusehen, wies die Fibroblastenzelllinie CHO insgesamt nur eine sehr schwache Aufnahme gegenüber allen Emulsionen auf. Bei 37 °C wurden ^{Cⁿ}PFCs zwar nahezu kontinuierlich über 80 Minuten aufgenommen, aber es kam nur zu einem sehr leichten Anstieg der MFI (*mean fluorescence intensity*), bis nach 24 Stunden das Signal leicht abfiel. Bei Inkubation der CHO-Zellen mit ^{Cⁿ}PFCs bei 4 °C war das Anfangssignal noch schwächer als bei 37 °C und stagnierte danach im Wesentlichen. Erst nach 24 Stunden zeigte sich ein geringer Anstieg in der Signalstärke. ^{Cⁿ/PEG}PFCs wiesen bei beiden Temperaturen ein ähnliches Verhalten auf: Initial ein geringer Wert, welcher über 80 Minuten stagnierte und schließlich nach 24 Stunden geringfügig anstieg (Abbildung 7.3 A, oben).

Die Makrophagenlinie J774 zeigte erwartungsgemäß insgesamt eine deutlich stärkere zelluläre Aufnahme der ^{Cⁿ}PFCs als die CHO-Zellen. Die Inkubation bei 37 °C führte insbesondere in den ersten 5 Minuten zu einer erheblichen Zunahme der MFI, welche zunächst weiter anstieg, dann jedoch später wieder langsam absank. Allerdings ließ sich nach 24 Stunden ein deutlicher Abfall der MFI verzeichnen. Wie absehbar, zeigten die ^{Cⁿ}PFCs bei 4 °C insgesamt deutlich geringere MFI-Werte. Auch hier konnte in den ersten 5 Minuten der stärkste Anstieg der MFI gemessen werden, die über die Zeit kontinuierlich anwuchs und nach 80 Minuten in etwa das gleiche Niveau erreichte wie bei 37 °C. Allerdings ließ sich hier auch noch ein Anstieg nach 24 Stunden beobachten. Demgegenüber führte die PEGylierung der ^{Cⁿ}PFCs zu einer massiven Hemmung der PFC-Aufnahme durch die J774 Makrophagen über den gesamten Beobachtungszeitraum: Hier waren über die ersten 80 Minuten hinweg nur sehr geringe Fluoreszenzsignale auszumachen und erst nach 24 Stunden war ein gelinder Anstieg in der MFI meßbar (Abbildung 7.3 A, Mitte).

Die zweite Makrophagenlinie RAW zeigte eine noch stärkere PFC-Aufnahme als die J774-Zellen. Eine Inkubation der ^{Cⁿ}PFCs bei 37 °C führte zu einem starken, kontinuierlich über 80 Minuten

ansteigendem Fluoreszenzsignal, welches erst nach 24 Stunden erheblich abfiel. Inkubation bei 4 °C ergab ähnliche Ergebnisse: Auch hier kam es über 80 Minuten hinweg zu einem kontinuierlichen Anstieg, wenn auch in geringerem Maße als bei 37 °C. Nach 24 Stunden ließ sich jedoch noch ein weiterer Anstieg des Signals verzeichnen. Ebenso ergab sich für die PEGylierten C_{fl} PFCs ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal, welches über den gesamten Messzeitraum nahezu stagnierte und nur nach 24 Stunden geringfügig anstieg (Abbildung 7.3 A, unten).

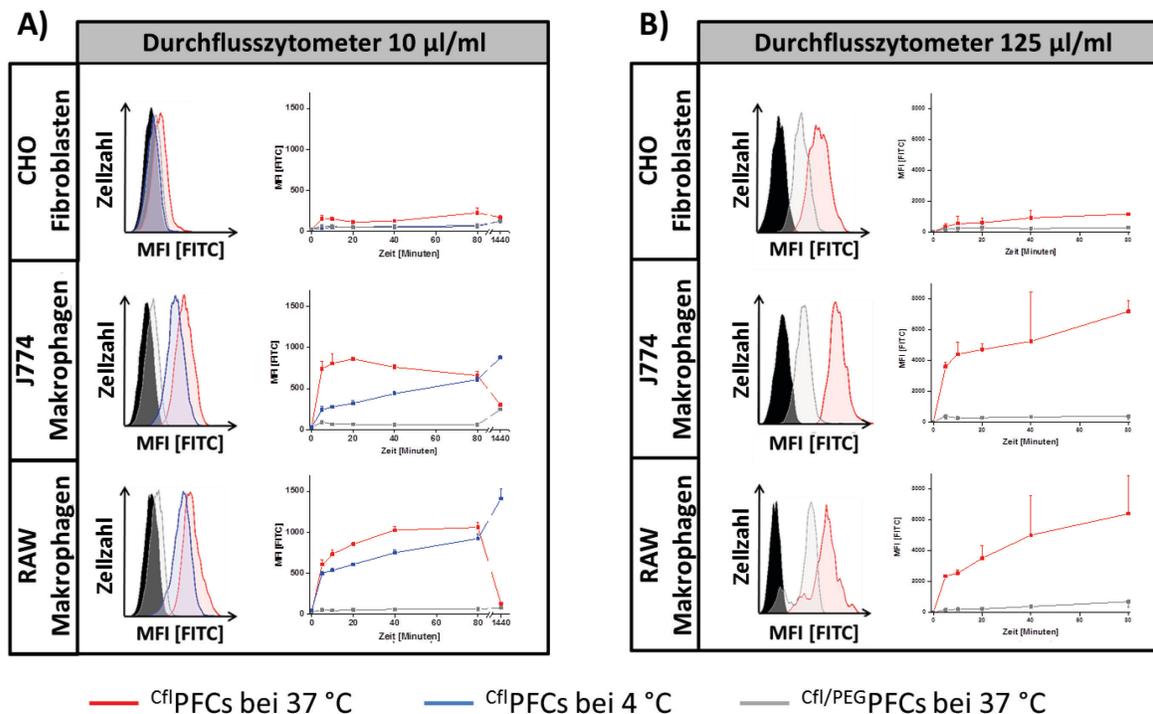


Abbildung 7.3: Zelluläre Aufnahmekinetik der C_{fl} PFCs und C_{fl}/PEG PFCs.

A) Zelluläre Aufnahme der C_{fl} PFCs und C_{fl}/PEG PFCs durch CHO-, J774- und RAW-Zellen bei geringer Partikelkonzentration (10 µl/ml). Untersucht wurde die Aufnahmekinetik über 24 Stunden von C_{fl} PFCs bei 37 °C (rot), bei 4 °C (blau) und von C_{fl}/PEG PFCs bei 37 °C (grau). **B)** Aufnahme der PFCs durch die unterschiedlichen Zelllinien bei hoher Partikelkonzentration (125 µl/ml). Insgesamt lassen sich ähnliche Verläufe wie bei der geringen Konzentration beobachten, allerdings liegen die MFI deutlich höher. Im Histogramm sind exemplarisch die Daten des 80-Minuten-Wertes dargestellt. $n=3 \pm SD$ für alle Messungen.

Die Verwendung der höheren PFC-Konzentration (125 µl/ml bei 37 °C) ergab ähnliche Ergebnisse wie bei der geringen Konzentration, nur lag die MFI insgesamt deutlich höher. Insbesondere bei den beiden Makrophagenzelllinien konnte ein sehr starker Anstieg der MFI über die 80 Minuten hinweg beobachtet werden und der abschirmende Effekt der PEGylierung trat hier noch deutlicher zu Tage (Abbildung 7.3 B).

Neben den Carboxyfluorescein-markierten Emulsionen wurden exemplarisch auch Rhodamin-markierte Emulsionen für die *in vitro* Studien verwendet, um zu überprüfen, ob das Fluorochrom einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme hat. Hierfür wurden nur die geringen Konzentrationen an Rho PFCs und $^{Rho/PEG}$ PFCs bei 37 °C eingesetzt. Wie bereits zuvor bei den Carboxyfluorescein-markierten Emulsionen wurde die Aufnahme der Rho PFCs und $^{Rho/PEG}$ PFCs in CHO-Fibroblasten sowie in J774- und RAW-Makrophagen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden im Wesentlichen die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen bestätigt (Abbildung 7.4 A).

Für die CHO-Zellen zeigte sich wiederum nur eine geringe Aufnahme für beide Emulsionen, wobei die Signale der Rho PFCs stets etwas stärker waren als die der $^{Rho/PEG}$ PFCs (Abb. 7.4 A, oben). Demgegenüber konnte in J774-Zellen bei Inkubation mit Rho PFCs bereits initial ein starker Anstieg der MFI beobachtet werden, welche dann im Folgenden nochmals leicht anstieg und nach 24 Stunden leicht absackte. Auch hier führte eine PEGylierung nur zu einer sehr geringen PFC-Aufnahme – selbst nach 24 Stunden war nur ein äußerst geringer Anstieg der MFI messbar (Abbildung 7.4 A, mittig). Ähnlich wie bei den Cfl-Experimenten zeigten RAW-Makrophagen die stärkste Aufnahmekapazität für Rho PFCs mit einem kontinuierlichen Anstieg über 80 Minuten, aber einer deutlichen Abnahme der MFI nach 24 Stunden. Im Vergleich dazu konnte bei Inkubation mit $^{Rho/PEG}$ PFCs kaum ein Signal detektiert werden. Erst nach 24 Stunden war ein geringer Zuwachs der MFI messbar (Abbildung 7.4 A, unten).

Um zu überprüfen, ob sich der starke Effekt der PEGylierung auf die zelluläre Aufnahme auch mittels ^{19}F -MRT darstellen lässt, wurden zudem MRT-Messungen von CHO-, J774- und RAW-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Cfl PFCs bzw. $^{Cfl/PEG}$ PFCs durchgeführt, um den Gesamtfluorgehalt zu bestimmen (Abbildung 7.4 B). Wie bereits zuvor auch in den durchflusszytometrischen Messungen konnten bei CHO-Zellen keine klaren Unterschiede zwischen Cfl PFCs und $^{Cfl/PEG}$ PFCs beobachtet werden. Demgegenüber führte die Inkubation mit Cfl PFCs sowohl in J774- als auch RAW-Zellen zu einem deutlich höheren Fluorsignal als bei Inkubation mit $^{Cfl/PEG}$ PFCs. Wie außerdem zu erkennen ist, stieg der Fluorgehalt von CHO- über J774- bis hin zu RAW-Zellen immer mehr an. Auch dies deckt sich mit den zuvor erzielten Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abbildung 7.4 B).

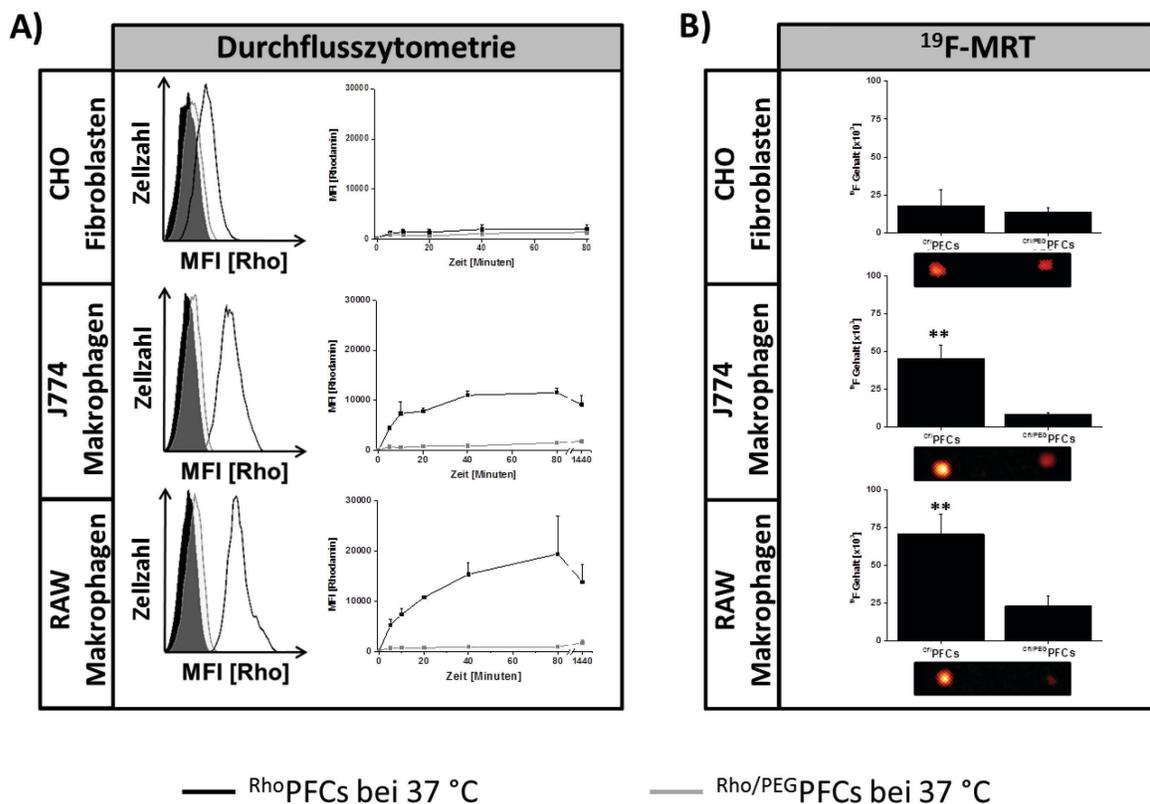


Abbildung 7.4: Zelluläre Aufnahmekinetik von RhoPFCs und Rho/PEGPFCs .

A) Gezeigt sind durchflusszytometrische Analysen von CHO (oben), RAW (mitte) und J774 (unten), die mit RhoPFCs (schwarze Linie) bzw. Rho/PEGPFCs (graue Linie) inkubiert wurden. Im Histogramm sind exemplarisch die Daten des 80-Minuten-Wertes dargestellt. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messungen. **B)** ^{19}F -MRT-Messungen von CHO-, J774-, und RAW-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit C_{11}PFCs oder $\text{C}_{11}/\text{PEGPFCs}$. Unter den Graphen ist beispielhaft eine Fluormessung dargestellt. $n=3-4 \pm \text{SD}$ für alle Messungen. ** = $p < 0,01$.

7.1.1.3 Der Effekt einer PFC-PEGylierung auf *ex vivo* isolierte murine Immunzellen

Nachdem die Funktionalität der PEGylierung zur Verminderung der Aufnahme durch Zellen in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob dies auch für primär isolierte murine Immunzellen der Fall ist. Hierfür wurde die Aufnahme von C_{11}PFCs und $\text{C}_{11}/\text{PEGPFCs}$ in neutrophile Granulozyten, klassische und nicht-klassische Monozyten, B-Zellen sowie zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen untersucht. Erneut wurde die Aufnahme der Emulsionen über 80 Minuten durchflusszytometrisch analysiert (siehe 6.3.1). Da die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln maßgeblich über die Proteincorona bestimmt wird, welche sich bei der Zirkulation der Partikel im Blut um die Nanopartikel bildet,¹²⁸ wurde die Aufnahme der C_{11}PFCs und $\text{C}_{11}/\text{PEGPFCs}$ in Vollblut untersucht, um den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Erneut wurden die Zellen mit den Emulsionen sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C inkubiert, um Aufnahme und passive Adhäsion der

Emulsionen an die Zelloberfläche unterscheiden zu können. Anschließend wurden zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen, die Immunzellen isoliert und hinsichtlich ihrer Aufnahmekinetik mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 7.5 A zusammengefasst. Für die statistische Auswertung wurde zusätzlich die AUC (*area under the curve*) ermittelt, also die Menge an Partikeln, welche über den gesamten Beobachtungszeitraum (80 Minuten) aufgenommen wurden (Abb. 7.5 B).

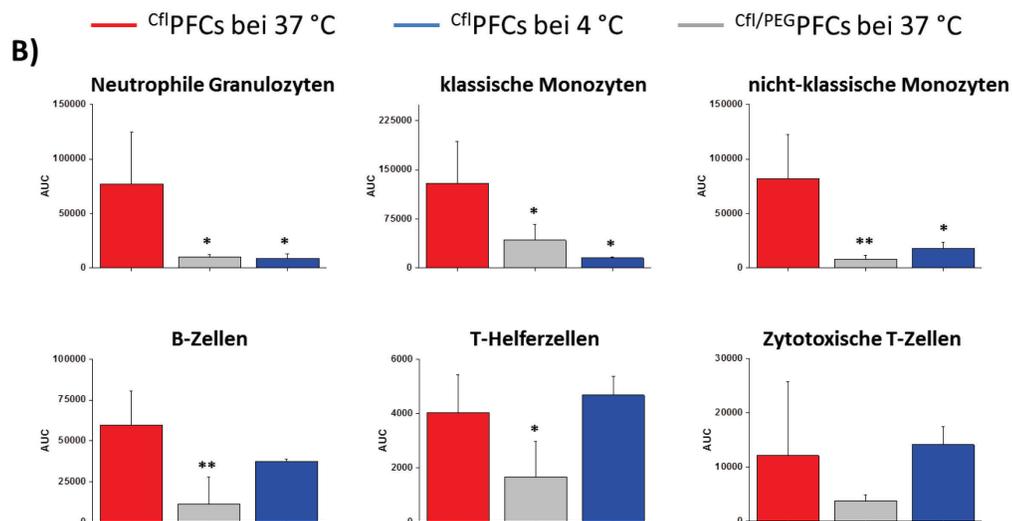
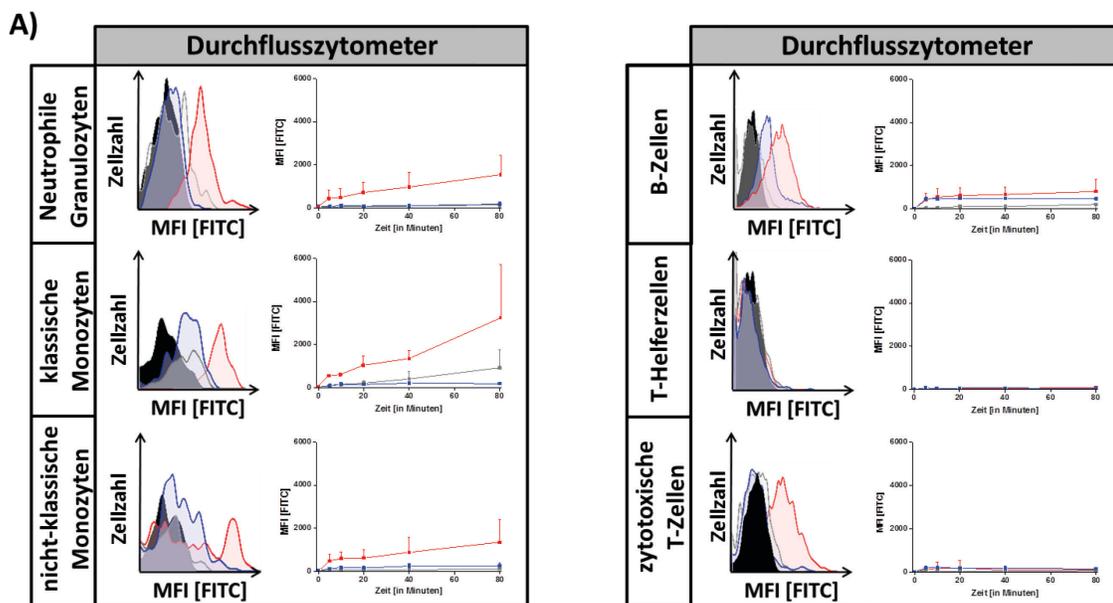


Abbildung 7.5: Zelluläre Aufnahme von $C_{fl}PFCs$ und $C_{fl/PEG}PFCs$ von murinen Immunzellen in Vollblut.

Dargestellt ist die Aufnahme von $C_{fl}PFCs$ bei 37 °C (rot), bei 4 °C (blau) sowie der $C_{fl/PEG}PFCs$ bei 37 °C (grau) durch murine Immunzellen, welche mittels Durchflusszytometrie analysiert wurde. Im Histogramm sind exemplarisch die Daten des 80-Minuten-Wertes dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die AUC-Werte der einzelnen Immunzellsubklassen. $n = 4-6 \pm SD$ für alle Messungen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Wie hieraus ersichtlich, zeigten zum einen neutrophile Granulozyten, klassische sowie nicht-klassische Monozyten und zum anderen B-, T-Helfer- sowie zytotoxische T-Zellen vergleichbare Aufnahmemuster für die unterschiedlichen Emulsionen. Bei den phagozytotischen Zellen führte die Inkubation mit C^n PFCs bei 37 °C erwartungsgemäß zu einer kontinuierlichen Zunahme der MFI über 80 Minuten, wohingegen Exposition bei 4 °C als auch PEGylierung die PFC-Aufnahme nahezu völlig unterband. Demgegenüber war bei T- und B-Zellen selbst bei 37 °C nahezu keine Inkorporation von C^n PFCs zu beobachten. Interessanterweise wurden hier die niedrigsten Aufnahmewerte für C^n/PEG PFCs detektiert.

Um zu untersuchen, inwieweit die im Vollblut vorhandenen Plasmaproteine durch Coronabildung um die Nanoemulsionen Einfluss auf deren Aufnahme nehmen, wurden die Immunzellen im nächsten Schritt mit C^n PFCs oder C^n/PEG PFCs in einem Protein-reduzierten Puffer inkubiert. Hierfür wurde MACS-Puffer verwendet, der nur BSA als Zusatz und somit einen deutlich verringerten Anteil an Plasmaproteinen enthält. Ähnlich wie zuvor im Vollblut wurden die isolierten Immunzellen über einen Zeitraum von 80 Minuten bei 37 °C inkubiert, zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen und die Aufnahme der Emulsionen in die Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 7.6 fällt insgesamt auf, dass die Reduktion der Plasmaproteine bei allen Zelltypen zu einem starken Anstieg der Partikelaufnahme in der initialen Inkubationsphase führte, die danach aber nicht mehr weiter zunahm und zum Teil sogar von einem Abfall der MFI begleitet war (siehe hierzu nächstes Kapitel). Bemerkenswerterweise wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls eine deutliche PFC-Aufnahme durch B- und T-Zellen beobachtet. Offenbar gibt es im Blut Bestandteile, die zu einer Dämpfung der initialen Aufnahme bzw. zu deren vollständiger Hemmung bei bestimmten Zelltypen führen. Nichtsdestotrotz konnte auch bei reduziertem Proteingehalt im Puffer die Partikelinkorporation durch PEGylierung der PFCs in allen Zelltypen massiv reduziert werden (Abbildung 7.6).

Zusammengenommen zeigen die bisherigen Ergebnisse somit, dass die PEGylierung der PFC-Oberfläche unter allen untersuchten Bedingungen und in jedem verwendeten Zelltypus zu einer erheblichen Reduktion der PFC-Aufnahme führt.

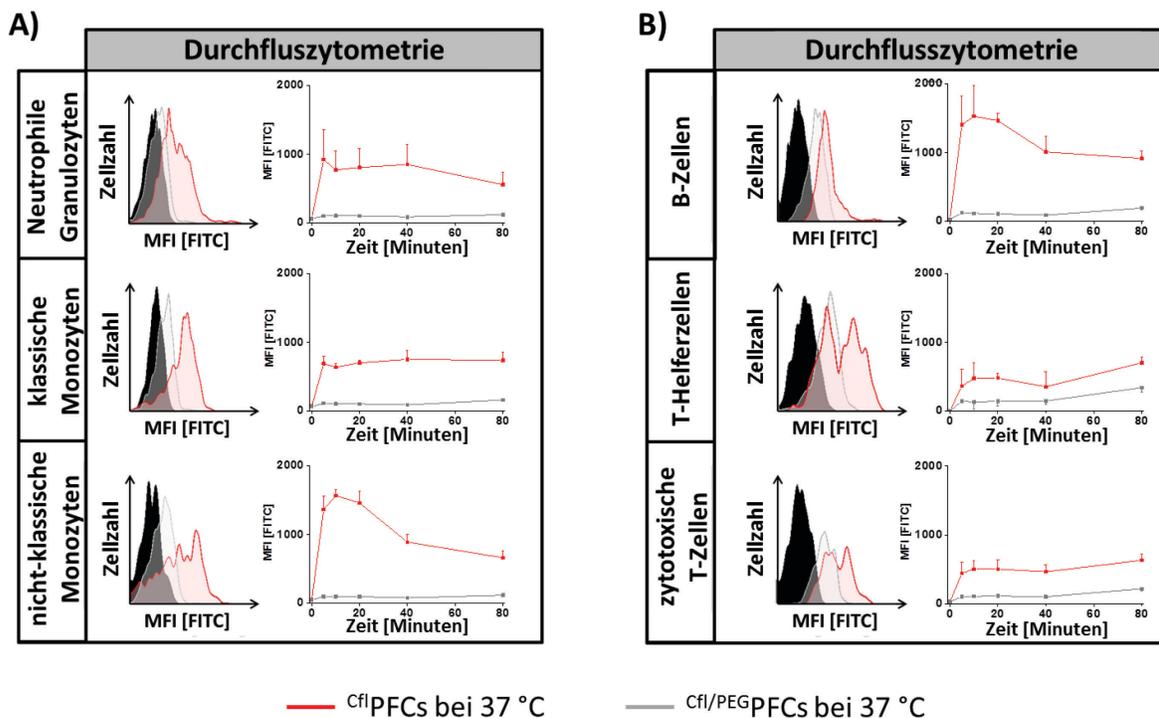


Abbildung 7.6: Zelluläre Aufnahme von C^{fl} PFCs und $C^{fl/PEG}$ PFCs von murinen Immunzellen in MACS-Puffer.

Gezeigt ist die Aufnahme von C^{fl} PFCs (schwarz) bzw. $C^{fl/PEG}$ PFCs (grau) durch verschiedene murine Immunzellsubtypen über einen Zeitraum von 80 Minuten in Vollblut (A) bzw. in MACS-Puffer (B). Im Histogramm sind exemplarisch die Daten des 80-Minuten-Wertes dargestellt. $n=3 \pm SD$ für alle Messungen.

7.1.1.4 Abnahme des Fluoreszenzsignals von PFCs nach Internalisierung

Eine interessante, nicht erwartete Nebenbeobachtung bei den bisherigen durchflusszytometrischen Messungen war die in einigen Experimenten registrierte Abnahme des zellulären PFC-Fluoreszenzsignals über die Zeit (Abb. 7.3, 7.4 und 7.6). Dieser Effekt trat insbesondere bei C^{fl} PFCs nach 24-stündiger Inkubation auf (Abb. 7.3), war aber auch bei R^{ho} PFCs (Abb. 7.4) und deutlich kürzeren Inkubationsintervallen festzustellen (Abb. 7.6). Ein möglicher Grund für diese Signalabnahme kann in der Exposition der Fluorochrome gegenüber freien Radikalen liegen, die über den Inkubationszeitraum in der Zelle gebildet wurden. Daher wurde im nächsten Schritt die Stabilität des Cfl- und des Rho-Signals in den PFCs gegen freie Radikale überprüft. Dazu wurde als Radikalstarter 20 %iges H_2O_2 zu den Emulsionen (C^{fl} PFCs; $C^{fl/PEG}$ PFCs; R^{ho} PFCs; $R^{ho/PEG}$ PFCs) hinzugefügt (10 μ l zu 100 μ l Emulsion \rightarrow 2 % H_2O_2) und diese bei 37 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben abgenommen und die Fluoreszenz mittels IVIS (*in vivo imaging system*) bestimmt (siehe 6.1.3.3 Einfluss von freien Radikalen auf das Fluoreszenzsignal). Die gemessenen Fluoreszenzwerte

wurden jeweils auf die Startwerte bezogen, welche vor Zugabe des H_2O_2 (bzw. H_2O als Kontrolle) aufgenommen wurden.

Wie aus Abbildung 7.7 hervorgeht, kam es nach Zugabe von H_2O_2 zu CflPFCs zu einer steten Abnahme von deren Fluoreszenz, bis nach 3 Stunden nur noch ca. 25 % der Ausgangsfluoreszenz vorhanden waren. Hingegen führte die Zugabe von H_2O nur zu einer initialen Abnahme der Fluoreszenz von CflPFCs . Ähnliche Effekte wurden bei Cfl/PEGPFCs beobachtet. Demgegenüber erwies sich die Fluoreszenz von RhoPFCs bzw. Rho/PEGPFCs erheblich robuster gegen die Zugabe von H_2O_2 . Hier schwankte die MFI um den Ausgangswert und im Vergleich zur Zugabe von H_2O zeigte sich insbesondere in der initialen Phase ein nahezu deckungsgleicher Verlauf mit nur geringfügigem Verlust an Fluoreszenzsignal.

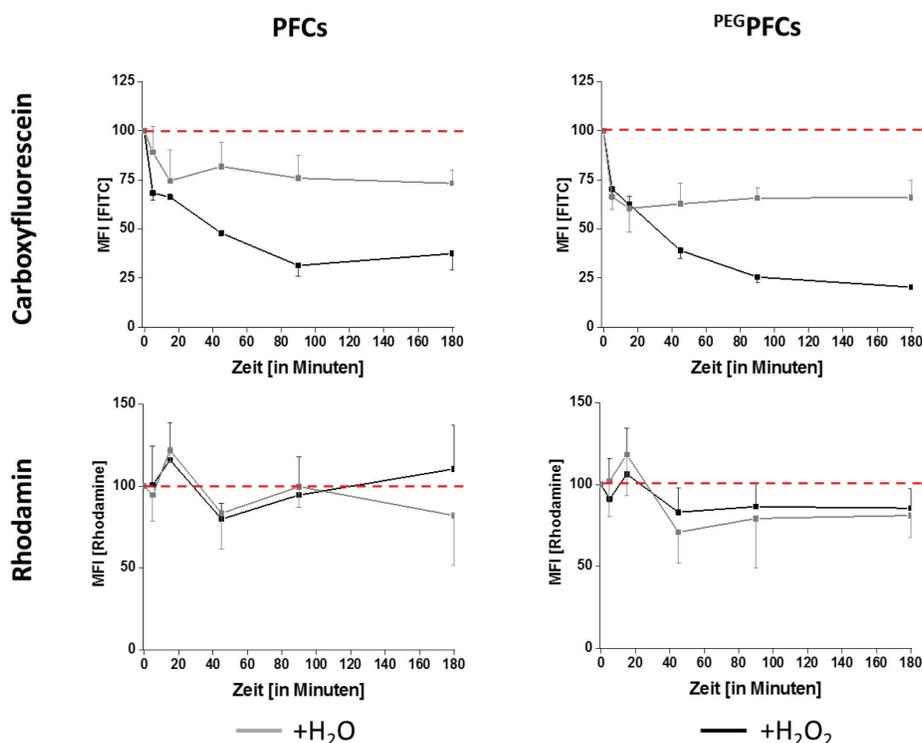


Abbildung 7.7: Einfluss von H_2O_2 auf das Fluoreszenzsignal von PFCs.

Gemessen wurde der Einfluss von H_2O_2 auf das Fluoreszenzsignal von PFCs. Dies wurde durch repetitive Messungen der Fluoreszenz durchgeführt. Für die graphische Darstellung wurden alle Messpunkte auf den Startwert normiert. In den H_2O -Kontrollen (graue Linie) konnte nur ein leichter Rückgang in der Fluoreszenz beobachtet werden. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messungen.

Diese Befunde reflektieren die beobachteten Unterschiede in der MFI nach Aufnahme von CflPFCs bzw. RhoPFCs durch J774- und RAW-Zellen (Abb. 7.3+7.4), die bereits eine deutlich höhere

Suszeptibilität der C^{fl} PFCs zum Verlust der Fluoreszenz nahe legten. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es in Abhängigkeit vom Fluorophor selbst bei relativ mildem oxidativen Stress bereits zu einer starken ‚Ausbleichung‘ der Fluoreszenz kommen kann. Dementsprechend ist die oben beschriebene MFI-Abnahme nach PFC-Internalisierung über die Zeit sehr wahrscheinlich auf die oxidative Zerstörung der Fluoreszenzstruktur in den Lysosomen zurückzuführen (siehe hierzu auch 7.1.2.4).

7.1.2 Modulation der Partikelgröße

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der PFC-Partikeloberfläche durch PEGylierung die Aufnahme in allen Zelltypen erheblich reduziert. Wie bereits erwähnt, spielt nicht nur die Oberflächenbeschaffenheit eine entscheidende Rolle für die Aufnahme, sondern auch die Größe der verwendeten Emulsion. Daher wurde im nächsten Abschnitt der Einfluss unterschiedlicher PFC-Durchmesser auf die Aufnahmeeigenschaften der Zellen untersucht.

7.1.2.1 Charakterisierung von PFCs und PEG PFCs unterschiedlicher Größe

Die Größe der Emulsionen spielt insbesondere für den Mechanismus der Partikelaufnahme in die Zelle eine wichtige Rolle; da größenabhängig unterschiedliche zelluläre Internalisierungswege aktiviert werden, wie z. B. Phagozytose oder Pinozytose.¹²⁹ Daher wurden, wie in 6.1.1 Herstellung verschiedener PFCs beschrieben, Partikel von unterschiedlichem Durchmesser hergestellt. Dies kann einfach durch Variation des Lipidgehaltes erreicht werden, da mit Verminderung des Emulgators, bei gleichbleibender Menge an Dispergant, aufgrund des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen, Partikel mit größerem Durchmesser entstehen.¹³⁰ Dementsprechend wurden PFCs hergestellt, die 20 % PFCE und 35, 17,5 oder 3,5 mM Lipid enthielten, was zu Partikelgrößen von ca. 100, 150 und 250 nm führte (siehe Abbildung 7.8). Im Rahmen dieser Größenexperimente sollte auch untersucht werden, ob der ‚stealth-effekt‘ einer PEGylierung durch die unterschiedlichen Durchmesser beeinflusst wird. Dazu wurden diese Partikel über Sterol-basierte Post-Insertion (SPIT; 6.1.2.1) mit 5 mol% Cholesterol-PEG₂₀₀₀-Methoxyl PEGyliert. Der Einfachheit halber wurden die unterschiedlichen Partikel anschließend nach ihrer näherungsweisen Größe benannt (100 PFCs, 150 PFCs, 250 PFCs) sowie die PEGylierte Form jeweils zusätzlich mit einem PEG gekennzeichnet ($^{100/PEG}$ PFCs, $^{150/PEG}$ PFCs, $^{250/PEG}$ PFCs). Für fluoreszenzbasierte Messungen wurden in die Oberfläche aller Emulsionen zusätzlich Rhodamin eingefügt.

SPIT bezeichnet ein Verfahren, welches sich den spontanen Einbau von Cholesterol in die Lipidhülle der Emulsionen zunutze macht. Durch Funktionalisierung des Cholesterols mit verschiedenen Liganden, in diesem Fall einer PEG-Kette, lassen sich sehr einfach und schonend Modifizierungen an den Emulsionen vornehmen. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass keine neuen Emulsionenchargen hergestellt werden müssen und diese daher besser mit den entsprechenden nicht-PEGylierten PFCs vergleichbar sind. Zunächst wurden von allen Partikeln mittels PCS der Durchmesser, die Größenverteilung, das ζ -Potenzial sowie, anhand von Fluoreszenz- und MRT-Messungen, die MFI sowie das ^{19}F -Signal bestimmt. Wie in Abbildung 7.8 zu erkennen, geht die Größenzunahme mit einem erhöhten PDI und einem negativeren ζ -Potenzial einher. Interessanterweise führte die PEGylierung bei allen, aber insbesondere bei den kleineren Partikeln (100+150 nm), zu einem noch negativeren ζ -Potenzial. Die Fluoreszenzmessungen zeigten bei den $^{250}\text{PFCs}$ erhöhte Werte, wohingegen hier der ^{19}F -Gehalt etwas verringert war. Alles in allem sind aber die verschiedenen großen Emulsionen hinsichtlich Größe, Größenverteilung, ζ -Potenzial, Fluoreszenz sowie ^{19}F -Gehalt durchaus vergleichbar.

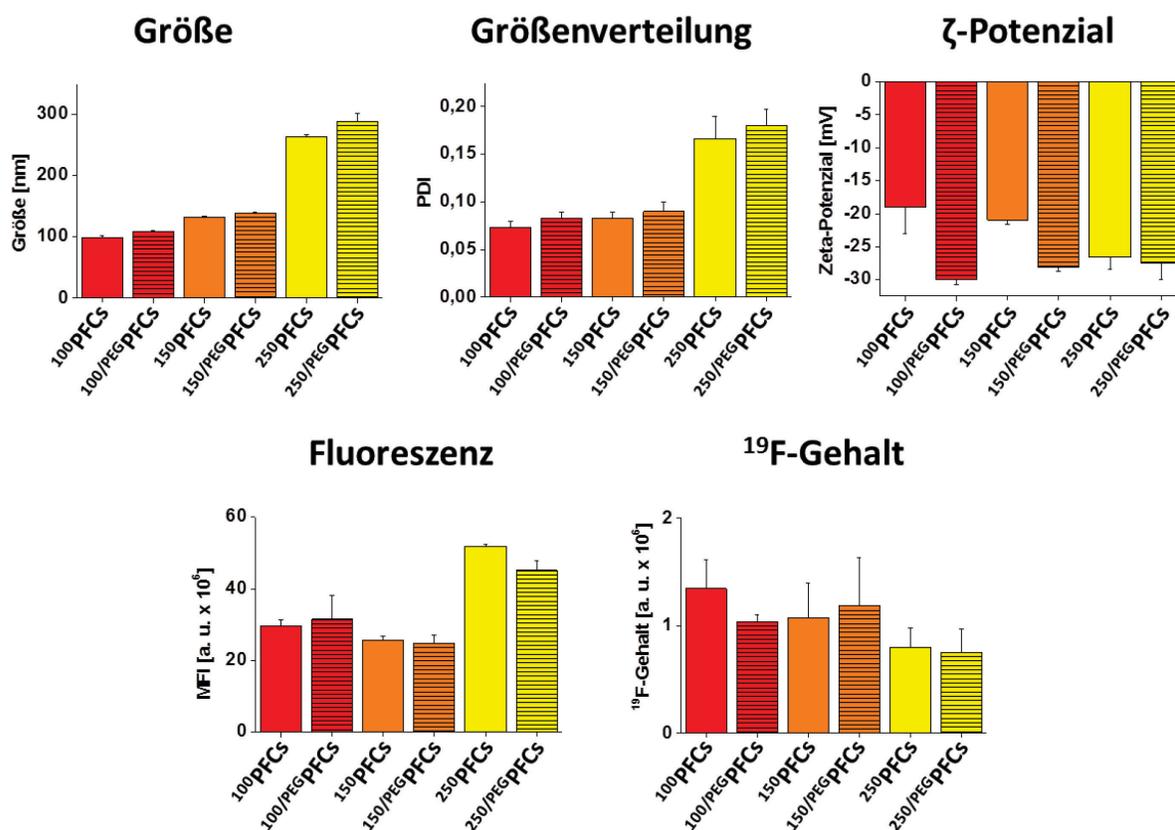


Abbildung 7.8: Charakterisierung der PFCs unterschiedlicher Durchmesser.

Oben: Über PCS-Messungen wurden die Größe, Größenverteilung sowie das ζ -Potenzial der Emulsionen gemessen. **Unten:** Des Weiteren sind die MFI und der Fluorgehalt dargestellt. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messungen.

7.1.2.2 Einfluss von Durchmesser und PEGylierung auf die zelluläre PFC-Aufnahme *in vitro*

Zunächst wurde die zelluläre Aufnahme der hergestellten Emulsionen *in vitro* – wiederum anhand CHO-, J774- und RAW-Zellen – über einen Zeitraum von 80 Minuten durchflusszytometrisch untersucht. Da die Fluoreszenzintensitäten der Emulsionen unterschiedlich waren, wurden die MFI-Werte der Zellen auf die zuvor gemessenen Fluoreszenzwerte der Emulsionen normiert. In Abbildung 7.9 sind sowohl die einzelnen Kinetiken (oben) als auch die AUC (unten) aus diesen Experimenten zusammengestellt. Wie insbesondere aus der unteren Darstellung ersichtlich ist, ergab sich für alle Zelltypen ein einheitliches Bild. Je größer die Partikel, desto stärker wurden sie aufgenommen – dies gilt insbesondere für die ²⁵⁰PFCs. Zwischen den Zelllinien wurden ähnliche Unterschiede wie zuvor beobachtet: Die beiden Makrophagenlinien J774 und RAW zeigten durchweg und für alle PFC-Größen eine deutlich höhere Partikelinkorporation als die CHO-Fibroblasten.

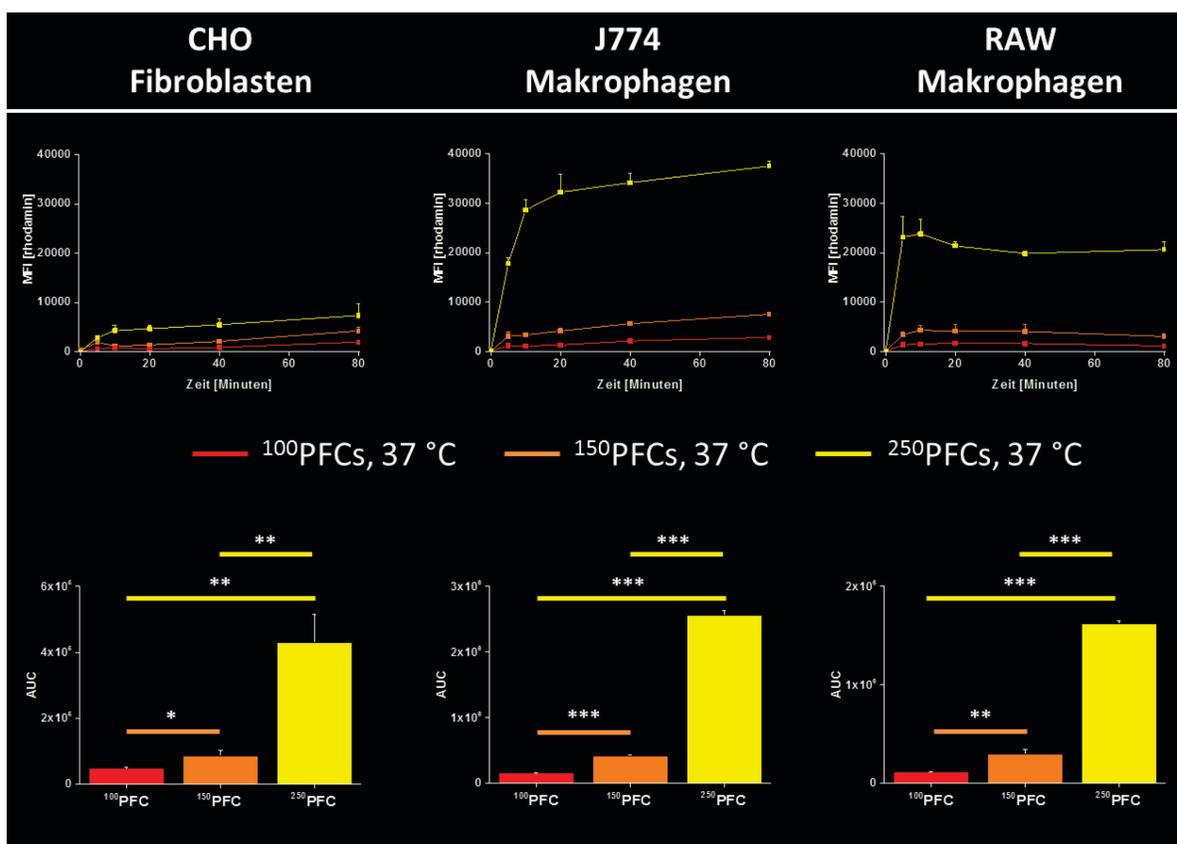


Abbildung 7.9: Zelluläre Aufnahme von Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser *in vitro*.

Obere Reihe: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von PFCs mit 100 nm, 150 nm und 250 nm Durchmesser durch CHO-, J774- und RAW-Zellen. Die Fluoreszenzsignale der Zellen wurden auf die Fluoreszenzwerte der Emulsionen normiert. $n = 3 \pm SD$ für alle Messpunkte. **Untere Reihe:** Auswertung der AUC von obiger Aufnahmekinetik (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Im nächsten Schritt wurden auch die PEGylierten PFCs unterschiedlicher Größe in die Analyse miteinbezogen. Obwohl für alle Zelltypen und für alle PFC-Größen die Aufnahme durch PEG-Insertion zumindest tendenziell reduziert werden konnte (Abb. 7.10), ist extrem auffällig, dass die Unterschiede zwischen PFCs und ^{PEG}PFCs gerade im Hinblick auf die größeren Emulsionen bei weitem nicht so ausgeprägt waren wie zuvor (vergleiche Abb. 7.9).

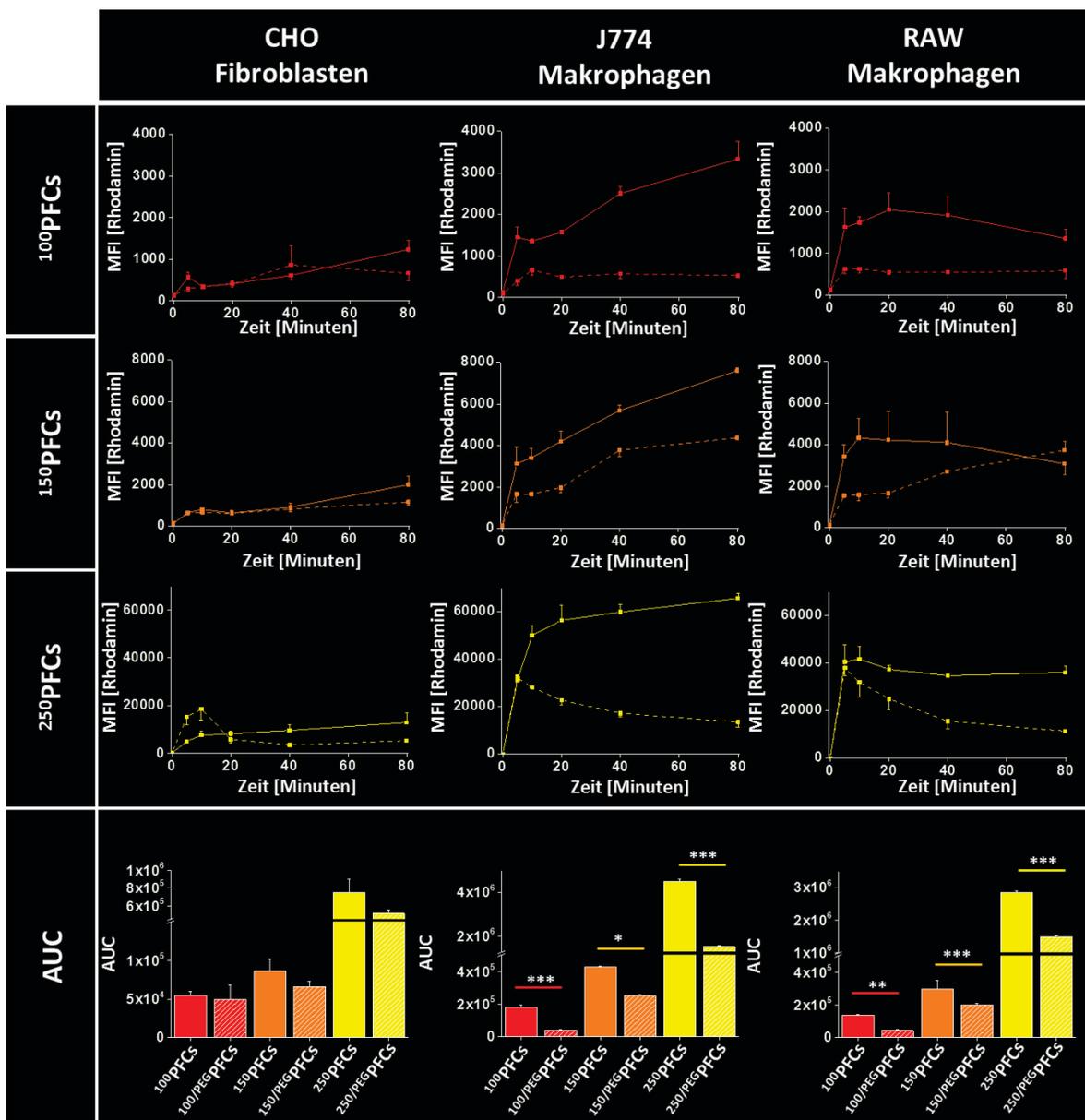


Abbildung 7.10: Zelluläre Aufnahme von PEGylierten Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser *in vitro*.

Mittels Durchflusszytometrie bestimmte Aufnahmekinetiken von PFCs (durchgängige Linie) und ^{PEG}PFCs (gestrichelte Linie) unterschiedlicher Durchmesser auf CHO-, J774- und RAW-Zellkulturlinien. Darstellung der AUC zeigt in allen Fällen die stärkste Aufnahme bei den ²⁵⁰PFCs und nur geringen Einfluss der PEGylierung auf die Signalstärke. n=3 ± SD für alle Messpunkte (* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

Ein Grund hierfür könnte in der PEGylierungsart liegen, da diese Partikel nicht persynthetisch mittels DSPE-PEG₂₀₀₀, sondern postsynthetisch durch Cholesterol-PEG₂₀₀₀ PEGyliert wurden. Daher wurde im nächsten Schritt eine Titrationsreihe mit verschiedenen PEGylierungsmengen (5 mol%, 25 mol%, 50 mol%, 75 mol%) durchgeführt und die zelluläre Aufnahme der Partikel durch J774-Zellen sowie humane Immunzellen überprüft. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Mengen an Cholesterol-PEG₂₀₀₀ mit den jeweiligen PFCs (¹⁰⁰PFCs, ¹⁵⁰PFCs, ²⁵⁰PFCs) über Nacht inkubiert. Für die Überprüfung der Aufnahme wurden die Emulsionen dann für 1 Stunde mit den J774-Zellen bzw. Blutmonozyten bei 37 °C inkubiert und anschließend die MFI durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 7.11 zu erkennen, wirkte sich der PEGylierungsgrad auf die PFC-Aufnahme für die drei untersuchten Partikelgrößen und beide Zelltypen vergleichbar aus. In allen Experimenten fiel die MFI bei zunehmender Konzentration an PEG (5 mol%, 25 mol%, 50 mol%) kontinuierlich ab und erst ab 75 mol% PEGylierung schwächte sich dieser Effekt ab.

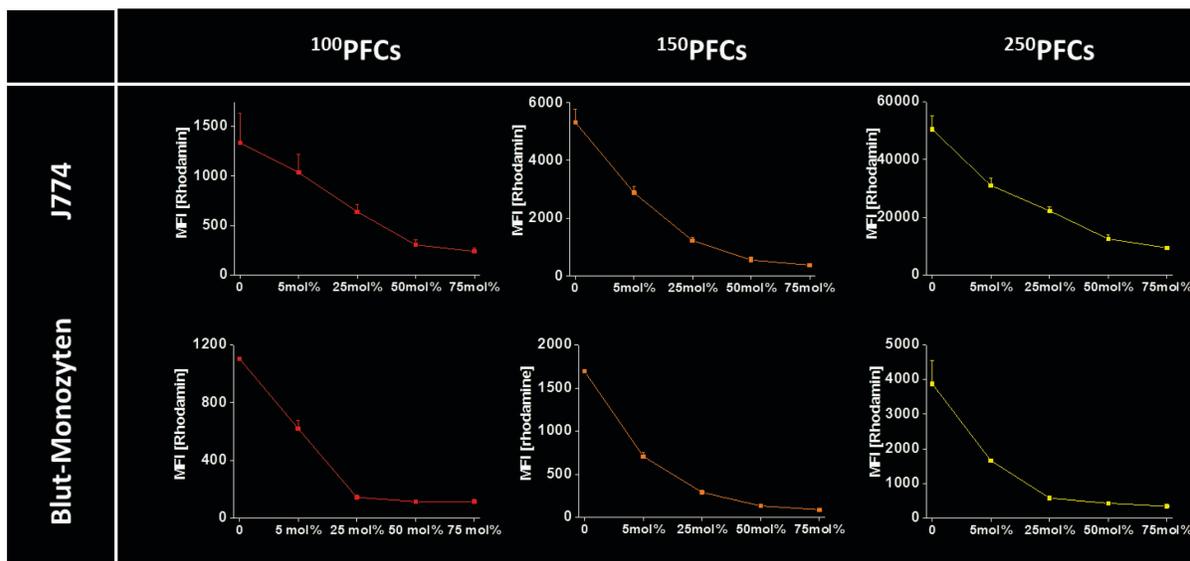


Abbildung 7.11: Titrationsreihe der PEGylierung von Emulsionen unterschiedlichen Durchmessers.

Durchflusszytometrische Messungen der Aufnahme verschieden stark PEGylierter PFCs in J774-Zellen und humane Monozyten. $n = 3 \pm SD$ für alle Messpunkte.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt auf die zelluläre PFC-Aufnahme auch mittels ¹⁹F-MRT nachweisen lässt. Dazu wurden J774-Zellen 24 Stunden mit den PFCs unterschiedlicher Größe (jeweils mit 5 bzw. 75 mol% PEG) inkubiert, sorgfältig gewaschen um freie PFCs zu entfernen, mittels Dichtegradient aufgetrennt und anschließend der ¹⁹F-Gehalt im MRT gemessen. In Abbildung 7.12 sind links MRT-Bilder von 15-ml-Falconröhrchen dargestellt, bei denen das ¹H-Signal in Grautönen und das überlagerte ¹⁹F-Signal in den Zellen in gelb/rot dargestellt ist. Die

Ficoll-Phase im unteren Teil des Röhrchens ist deutlich dunkler als die überschichtete wässrige Phase. Die Zellen befinden sich jeweils an der Grenze zwischen Ficoll- und wässriger Phase, auf der auch die ^{19}F -Signale zu registrieren sind. Wie klar zu erkennen, sind die erhaltenen Ergebnisse absolut konsistent zu obigen Fluoreszenz-Daten. Auch hier zeigte sich ein größenabhängiger Anstieg der PFC-Aufnahme, die mit zunehmendem PEGylierungsgrad massiv reduziert werden konnte.

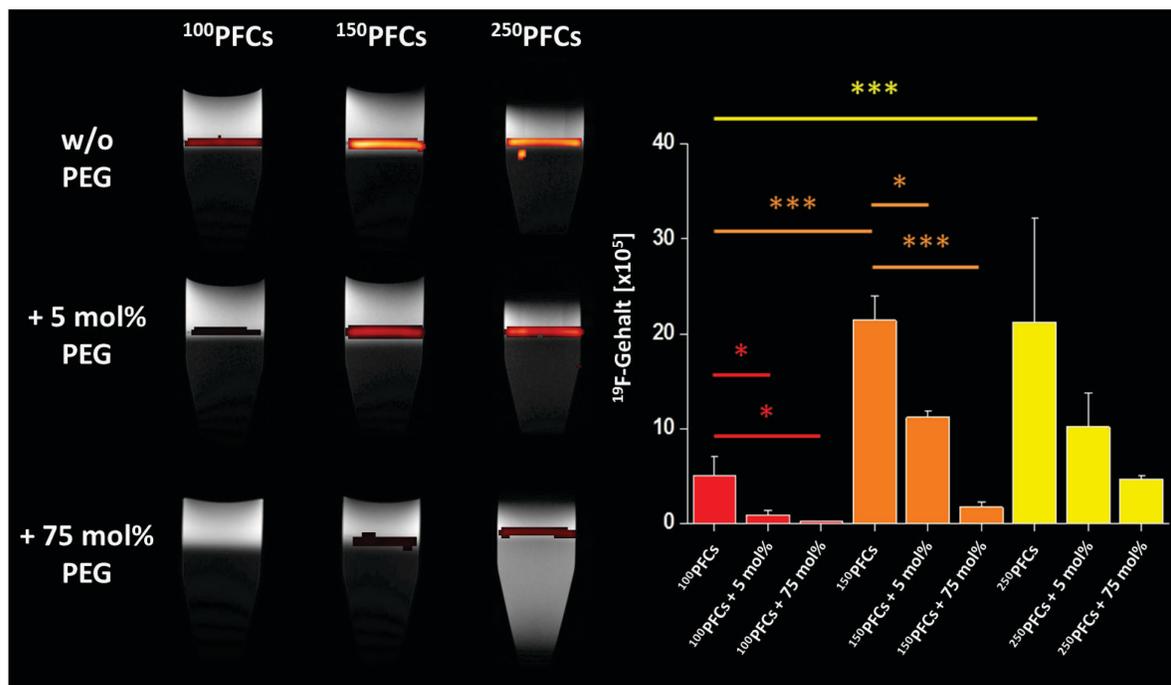


Abbildung 7.12: Zelluläre Aufnahme von PFCs und $^{\text{PEG}}$ PFCs unterschiedlichen Durchmessers *in vitro*.

Dargestellt sind die Messungen von J774-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit PFCs unterschiedlicher Größe sowie unterschiedlicher PEGylierungsmenge. Es konnte mit steigender Menge an PEG ein verringertes Signal in den Zellen gemessen werden. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse eindeutig, dass der ‚stealth-effekt‘ durch Erhöhung der PEG-Konzentration auf der PFC-Oberfläche stark verbessert werden kann.

7.1.2.3 Untersuchung der PFC-Aufnahme durch humane Immunzellen *ex vivo*

Zum Abschluss dieser Untersuchungsreihe wurden die an den immortalisierten Zelllinien *in vitro* beobachteten Größeneffekte noch an primären humanen Immunzellen *ex vivo* überprüft. Da in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die mittels SPIT PEGylierten Emulsionen bei Verwendung von 75 mol% die stärksten Abschirmungseffekte aufweisen, wurden die Immunzellen in den nachfolgenden Experimenten mit 75 mol% PEGylierten PFCs inkubiert.

Wie in Abbildung 7.13 dargestellt, ergab sich auch für die humanen Zellpopulationen ein ähnliches Bild wie zuvor. In allen Zelltypen erfolgte eine erhöhte PFC-Aufnahme mit ansteigender Partikelgröße, die durch PEGylierung jeweils signifikant gehemmt werden konnte. Interessanterweise wurde auch hier zum Teil ein transientser Verlauf des MFI-Signal beobachtet – insbesondere bei den Granulozyten. Da diese Zellpopulation über ein effizientes Katalysesystem von Oxidationsprozessen verfügt, ist dieser Effekt sicherlich wiederum auf die Zerstörung der fluorophoren Strukturen nach Internalisierung ins Lysosom zurückzuführen.

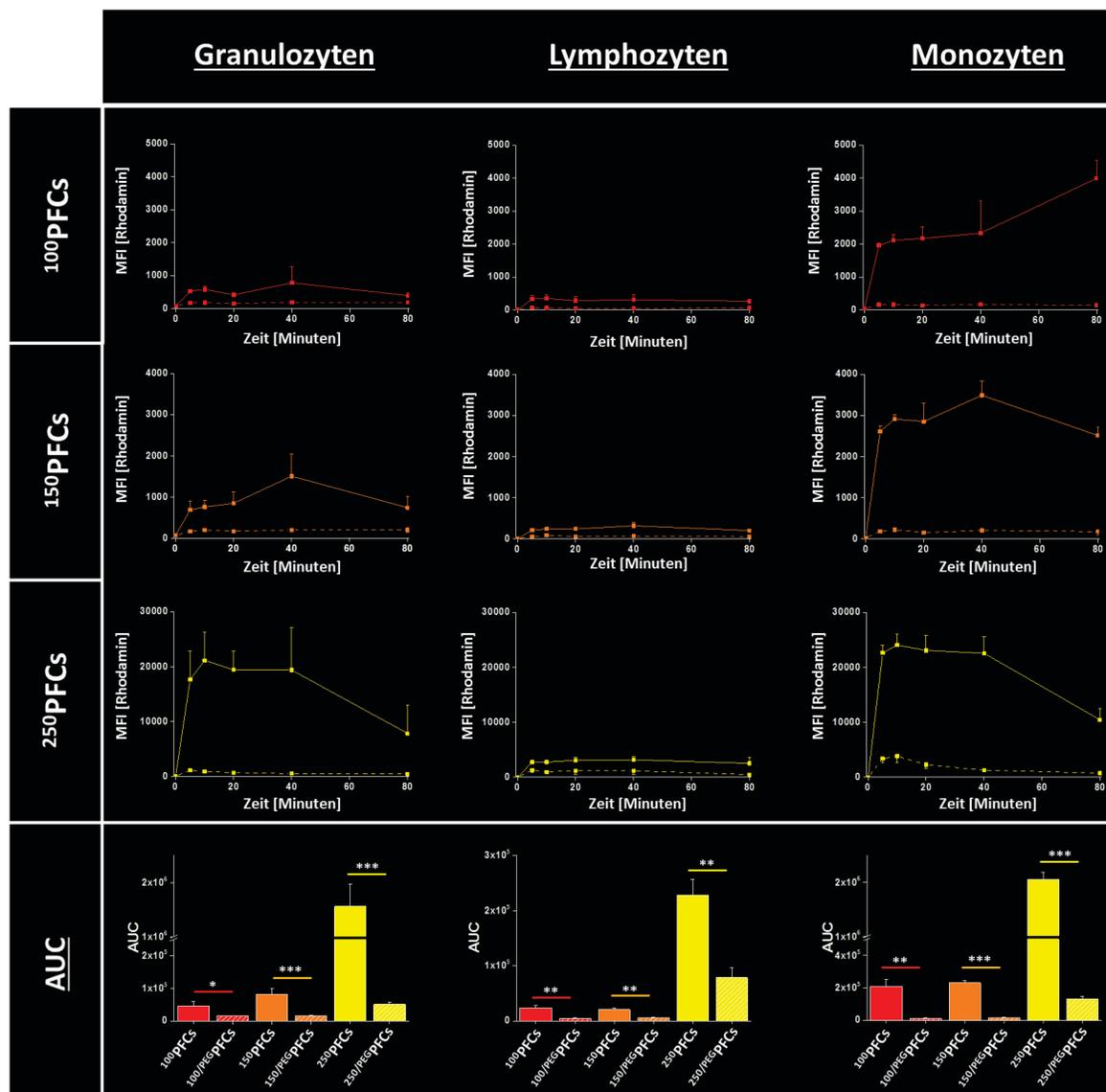


Abbildung 7.13: Zelluläre Aufnahme von PEGylierten Emulsionen unterschiedlicher Durchmesser *ex vivo*.

Gezeigt ist die Aufnahme von PFCs und PEG-PFCs unterschiedlicher Größe in humane Immunzellen. Es kann mit steigender Größe ein Zuwachs an Signal in sämtlichen Immunzellfraktionen festgestellt werden. Ebenso mindert eine 75 mol% PEGylierung in allen Fällen das Signal deutlich. Die Achsen weisen zwischen den Größen unterschiedliche Skalierungen auf. $n = 3 \pm SD$ für alle Messpunkte (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse jedoch eindeutig, dass die zelluläre PFC-Aufnahme umso stärker ausfällt, je größer die Partikel sind und der ‚*stealth-effekt*‘ durch Erhöhung der PEG-Konzentration auf der PFC-Oberfläche stark verbessert werden kann (zumindest in den hier untersuchten Größen- und Konzentrationsbereichen).

7.1.2.4 Auswirkung der PFC-Modifikation auf Inflammationsbildung und Gewebeverteilung *in vivo*

Nach den detaillierten Untersuchungen in Zellkultur bzw. an isolierten Immunzellen wurden die modifizierten PFCs in einem letzten Schritt hinsichtlich ihres *in vivo* Verhaltens charakterisiert. Von besonderem Interesse war dabei ihre Eignung für die Entzündungsbildung mittels ^{19}F -MRT, aber auch ihre Ausscheidungs- und Aufnahmekinetik aus dem Blut bzw. ins retikuloendotheliale System.

Als einfaches Entzündungsmodell wurde das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Matrigel/LPS-System verwendet. Hierfür wird flüssiges Matrigel mit LPS dotiert und in den Nacken einer Maus injiziert, wo es bei Körpertemperatur ein kompaktes LPS-Depot bildet, was innerhalb von 24 Stunden insbesondere zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten führt.¹³¹ Dementsprechend wurden 24 Stunden nach Implantation des Matrigels die verschiedenen PFCs in separaten Experimenten intravenös injiziert und die Mäuse nach weiteren 24 Stunden $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen unterworfen. Das implantierte Matrigel lässt sich anhand T2-gewichteter ^1H -MR-Bilder leicht als helle Struktur im Nackenbereich der Maus identifizieren (Abbildung 7.14 A+B). In anatomisch korrespondierenden ^{19}F -MR-Bildern konnten dann deutliche ^{19}F -Signale in und um das Matrigel herum detektiert werden, die aber hier überraschenderweise mit zunehmender Größe der PFCs abnahmen und auch nur geringfügig durch PEGylierung reduziert wurden (Abbildung 7.14 B+C).

Zur Klärung dieser unerwarteten Ergebnisse wurde zunächst in parallel durchgeführten Experimenten die Halbwertszeiten der verschiedenen PFCs im Blut sowie ihre Einwaschkinetiken in Milz und Leber untersucht. Hierfür wurden den Mäusen die entsprechenden Emulsionen ($^{100}\text{PFCs}$, $^{150}\text{PFCs}$, $^{250}\text{PFCs}$) intravenös verabreicht und anschließend das ^{19}F -Signal in Blut, Leber und Milz zu bestimmten Zeitpunkten nach Injektion (1, 3, 6, 24 Stunden) quantifiziert (Abbildung 7.14, D). Dabei zeigte sich, dass die PFCs mit zunehmender Größe deutlich schneller aus dem Blutstrom eliminiert werden und dementsprechend früher in Leber und Milz akkumulieren. Bereits zum ersten Messzeitpunkt (1 Stunde nach PFC-Gabe) fand sich im Blut für $^{250}\text{PFCs}$ nur ca. $\frac{1}{4}$ des ^{19}F -Signals verglichen mit dem für die $^{100}\text{PFCs}$ und parallel dazu jeweils doppelt so viel in den beiden retikuloendothelialen Organen.

Offenbar ist die verstärkte Konkurrenz von Leber und Milz um die PFC-Aufnahme eine unerwünschte Begleiterscheinung bei Vergrößerung des Partikeldurchmessers.

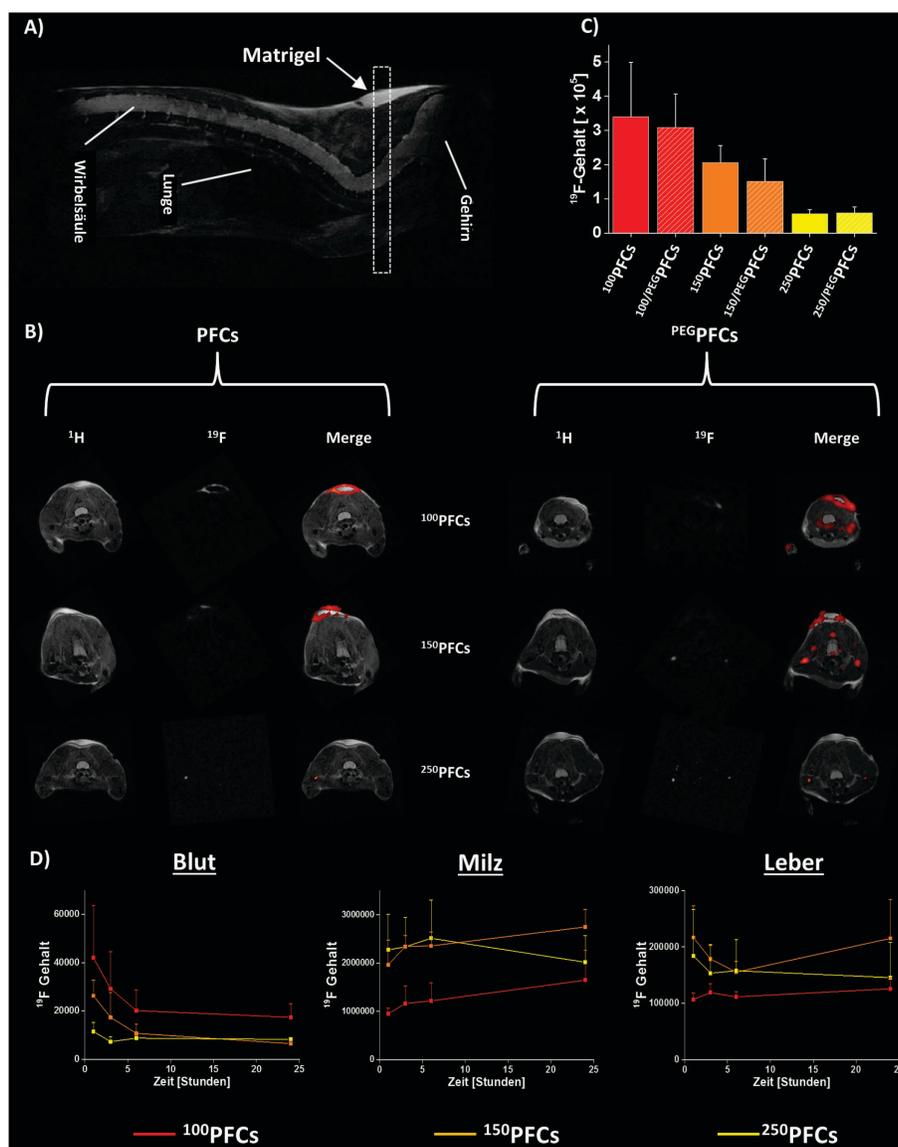


Abbildung 7.14: In vivo Aufnahme von PFCs mit unterschiedlichem Durchmesser.

A + B) $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT der Entzündung im Matrigel/LPS Modell. 50 μl Matrigel mit 50 μg LPS wurde subkutan in den Nackenbereich von Mäusen injiziert, um eine lokale Entzündungsreaktion auszulösen. Nach 24 Stunden wurden PFCs mit unterschiedlichem Durchmesser i.v. injiziert und weitere 24 Stunden $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen durchgeführt. Das implantierte Matrigel lässt sich deutlich als helle Struktur in der T2-gewichteten ^1H -MRT darstellen (links, sagittales Bild; gelber Pfeil). Die Bestimmung des ^{19}F -Signals im Matrigel erfolgte aus axialen Schichten über den kompletten Matrigelbereich. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte. **C)** Auswertung der AUC (*area under the curve*) der ^{19}F -Messungen im Matrigel nach Injektionen der PFCs unterschiedlicher Größe. Erkennbar ist die mit der Größenzunahme einhergehende Abnahme des ^{19}F -Signals, unabhängig von einer PEGylierung. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte. **D)** Ein- und Auswaschkinetiken der PFCs unterschiedlicher Größe. Erkennbar ist die Abnahme des ^{19}F -Signals über die 24 Stunden hinweg aus dem Blut, wobei dies mit zunehmender Größe umso schneller von statten geht. Parallel dazu kommt es zu einem Einwaschen in Leber und Milz. Hier weisen die 100PFCs deutlich geringere Signale auf als 150PFCs und 250PFCs. $n=3 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte.

Um zu überprüfen, ob dabei überhaupt noch eine effektive Immunzellbeladung erfolgt, wurden die $^{100}\text{PFCs}$, $^{150}\text{PFCs}$ bzw. $^{250}\text{PFCs}$ erneut intravenös injiziert, nach 1 Stunde Blutproben entnommen und die Aufnahme in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie aus Abbildung 7.15 A ersichtlich, ergab sich dabei im Wesentlichen das bereits bekannte Bild: Mit steigendem Durchmesser der Emulsionen geht auch *in vivo* eine verstärkte PFC-Aufnahme in alle untersuchten Immunzellfraktionen einher, führt aber nicht zur Anreicherung der PFCs in einer bestimmten Zellart.

Im nächsten Schritt wurde die PFC-Beladung der in das Matrigel eingewanderten Zellen untersucht. Hierfür wurden die implantierten Matrigele aus den Mäusen herauspräpariert, die Zellen aus dem Matrigel isoliert (siehe 6.4.2.3) und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um den zuvor beschriebenen Verlust des Fluoreszenzsignals (7.1.1.4) möglichst gering zu halten, wurden die Matrigele bereits 12 Stunden nach Injektion der verschiedenen Emulsion entnommen. Da zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich neutrophile Granulozyten in das Matrigel einwandern, wurde auch nur diese Immunzellfraktion untersucht. Allerdings waren die dabei detektierten MFI-Werte trotz des früheren Explantationszeitpunktes extrem niedrig und es ließen sich zwischen den verschiedenen Emulsionsgrößen keine deutlichen Unterschiede ausmachen (Abb. 7.15 B). Um auszuschließen, dass bereits in das Matrigel infiltrierte Granulozyten ein anderes Verhalten hinsichtlich der PFC-Aufnahme aufweisen, wurden zudem Granulozyten aus dem Matrigel isoliert, *ex vivo* mit den PFCs unterschiedlichen Durchmessers inkubiert und deren Aufnahmekinetik über 80 Minuten durchflusszytometrisch ermittelt (Abbildung 7.15 C). Dabei ergaben sich jedoch ganz ähnliche Zeitverläufe wie in Abb. 13 links mit der stärksten Aufnahme von $^{250}\text{PFCs}$.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass unter *in vivo* Bedingungen die Vergrößerung des Partikeldurchmessers von einer verstärkten Konkurrenz zwischen Immun- und anderen Zelltypen (z. B. in Milz und Leber) um die PFC-Aufnahme begleitet wird. Es erfolgt zwar dennoch eine Beladung der zirkulierenden Immunzellen, aber das hierfür zu Verfügung stehende Zeitfenster wird durch die verkürzte Verweilzeit der größeren Partikel im Blut deutlich reduziert. Ob dies auch zugleich der Grund für die geringere PFC-Akkumulation im Entzündungsherd (Abb. 7.14 B+C) ist, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

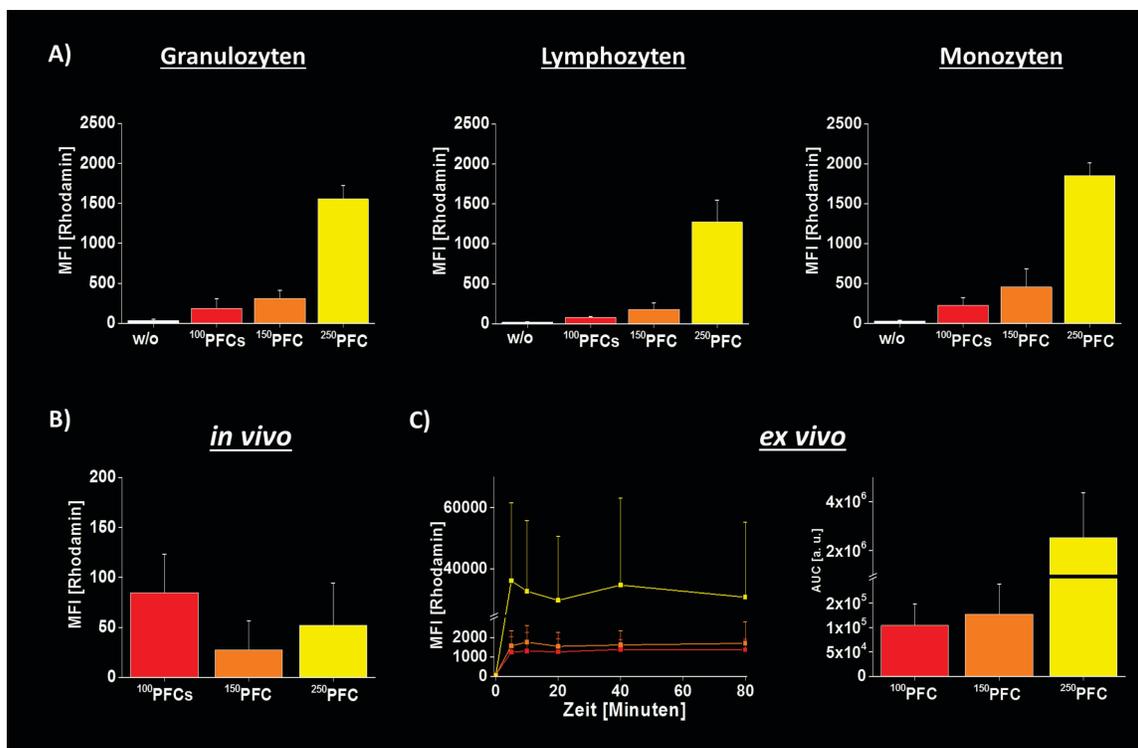


Abbildung 7.15: *In vivo* und *ex vivo* Aufnahme von PFCs durch Immunzellen im Matrigel/LPS-Modell.

A) *In vivo* Aufnahme von PFCs mit unterschiedlichem Durchmesser in murine Immunzellen aus dem Blut. Die Zellen wurden 1 Stunde nach Injektion aus den Mäusen isoliert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Bei allen drei Immunzellfraktionen konnte mit steigender Größe eine Zunahme im Fluoreszenzsignal festgestellt werden; $n=3 \pm SD$. **B)** Matrigel mit 50 μg LPS wurde s.c. implantiert, 24 Stunden später PFCs injiziert und nach weiteren 12 Stunden das Matrigel entnommen, die Zellen isoliert und durchflusszytometrisch bezüglich der PFC-Aufnahme untersucht. Die Daten sind $MW \pm SD$ für $n=4$. **C)** Isolation von neutrophilen Granulozyten aus dem Matrigel und anschließende *ex vivo* Inkubation mit den entsprechenden PFCs über 80 Minuten. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (links). Links: Zeitkinetik, rechts: AUC (area under the curve); $MW \pm SD$, $n=5$ für alle Messpunkte.

7.2 Markierung bestimmter Zellpopulationen über das aktive Targeting von PFCs

Nachdem im ersten Teil der Arbeit kritische Determinanten der PFC-Aufnahme untersucht worden sind, behandelt der zweite Teil das aktive Targeting von distinkten Zellpopulationen. Das bislang übliche Zelltargeting über Antikörper wirft oftmals Probleme auf, da hierdurch Immunreaktionen hervorgerufen werden können und nur in seltenen Fällen bindet ein Antikörper ausschließlich eine einzige Zellpopulation. Oftmals ist das Antigen auf mehreren verschiedenen Zelltypen in unterschiedlich starker Expression vorhanden, was die Spezifität deutlich vermindert und die Interpretation der Daten erschwert. Um diese Schwierigkeiten zu minimieren, wurden zwei alternative Systeme etabliert: Zum einen wurde mittels eines Peptids das spezifische Targeting von humanen Granulozyten untersucht. Zum anderen wurde ein synthetisches Rezeptorsystem entwickelt, welches über GFP spezifisch Zellen ansteuern kann.

7.2.1 Aktives Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten

In einem ersten Ansatz sollte zunächst ein spezifisches Targeting für neutrophile Granulozyten etabliert werden. Neutrophile Granulozyten spielen insbesondere in der akuten Phase des Myokardinfarkts eine entscheidende Rolle, wobei sie in diesem initialen Stadium den späteren Heilungsverlauf maßgeblich mitbestimmen. Daher wäre es sowohl für die Grundlagenforschung als auch die klinische Diagnostik von großem Interesse das Infiltrations- und Migrationsverhalten dieser Zellpopulation in der Frühphase nach Myokardinfarkt zu verfolgen.^{132,133} Zur spezifischen Ansteuerung der neutrophilen Granulozyten haben wir auf Peptide zurückgegriffen, deren Sequenz 1991 von Mazzucchelli et al. mittels eines Phagendisplays identifiziert wurden.¹³⁴ Peptide haben den Vorteil, dass sie sehr klein sind und aufgrund des fehlenden F_c-Teils, wie es bei Antikörpern der Fall ist, zu keiner Komplementaktivierung führen. Für unsere Zwecke haben wir dieses Peptid zusätzlich mit einem N-terminalen Carboxyfluorescein für fluoreszenzbasierte Messungen sowie einem C-terminalen Cystein für Kopplungsreaktionen ergänzt (Abbildung 7.16).

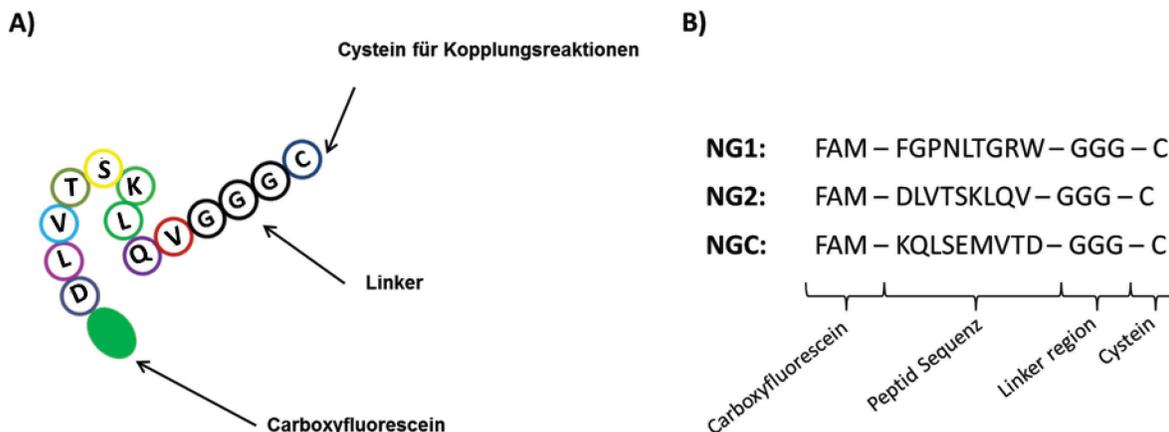


Abbildung 7.16: Übersicht über die verwendeten Peptide.

A) Schematische Darstellung des NG2-Peptides, welches für das aktive Targeting der humanen neutrophilen Granulozyten verwendet wurde. Dargestellt ist das eingefügte Carboxyfluorescein für durchflusszytometrischen Analysen, die eigentliche Peptidsequenz, eine Linkersequenz bestehend aus drei Glycinen und einem Cystein für Kopplungsreaktionen. **B)** Auflistung der verwendeten Peptide mit der genauen Peptidsequenz.

7.2.1.1 Bindung von NG2 an neutrophile Granulozyten

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die vorgenommene Modifikation an den Peptidsequenzen deren Bindungseigenschaften an neutrophile Granulozyten beeinflusst. Dafür wurden isolierte Immunzellen für 30 Minuten mit 1 µg/ml des entsprechenden Peptides bei 4 °C inkubiert und nach 2x Waschen die Bindung des Peptides an die verschiedenen Immunzellfraktionen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) durchflusszytometrisch analysiert. Dies wurde sowohl an humanen Blutproben, als auch an Proben von Maus, Ratte und Schwein durchgeführt. Drei verschiedene Peptide wurden verwendet: NG1, welches nach Stand der Literatur an alle neutrophilen Granulozyten binden sollte; NG2, welches eine Subpopulation der neutrophilen Granulozyten binden sollte und schließlich NGC als Kontrollpeptid.¹³⁴ Abbildung 7.17 zeigt zusammenfassend die Daten, die für die humanen Proben gewonnen wurden. Im Histogramm sind in schwarz ungefärbte Zellen dargestellt, in grau die mit dem jeweiligen Peptid inkubierten Zellen. Wie klar ersichtlich, konnte bei Verwendung von NG1 bei keiner der großen Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) eine Bindung ausgemacht werden (Abbildung 7.17, obere Reihe). Bei Inkubation mit NG2 zeigte sich bei einem Teil der Granulozyten ein starkes Signal, bei den Monozyten und Lymphozyten konnte hingegen kein Signal ausgemacht werden (Abbildung 7.17, mittlere Reihe). NGC führte bei Inkubation mit humanen Immunzellen zu keiner Bindung, weder bei den Granulozyten, noch bei den Monozyten oder Lymphozyten (Abbildung 7.17, untere Reihe). Bei Untersuchung anderer Spezies (Maus, Schwein, Ratte) konnte für keines der Peptide bei keiner Immunzellfraktion ein Signal ausgemacht

werden (Daten nicht gezeigt). Somit bindet nur NG2 an ca. 50-60% der humanen neutrophilen Granulozyten, während NG1 offenbar durch Modifikation der Aminosäuresequenz seine Bindungseigenschaften für diese Zellpopulation verloren hat.

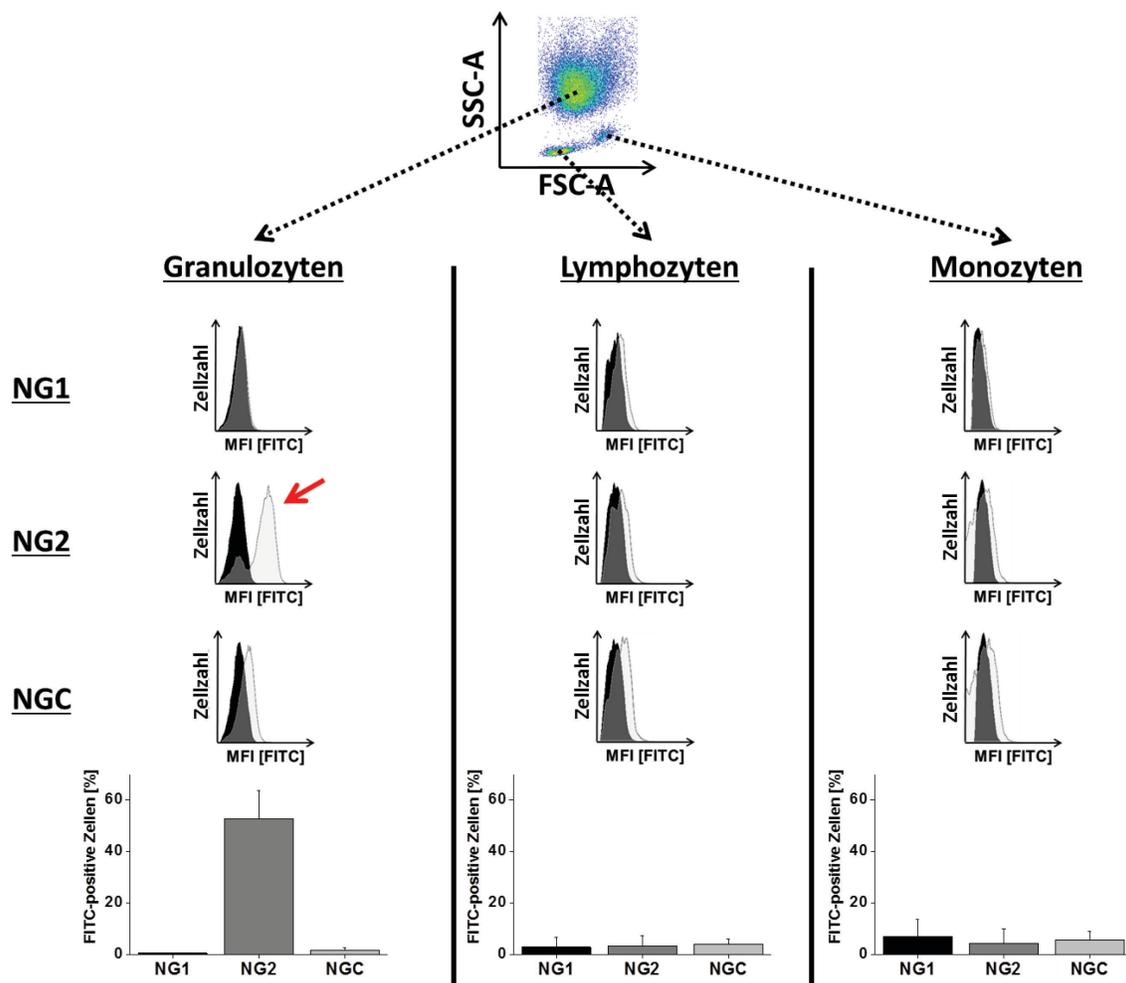


Abbildung 7.17: Spezifitätstest der Peptide für humane Granulozyten.

Die Spezifität der Peptide hinsichtlich humaner neutrophiler Granulozyten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Verwendet wurden drei unterschiedliche Peptide. NG1 sollte alle Granulozyten binden, weist aber nach der Modifizierung keine Spezifität mehr auf. NG2 sollte eine Teilpopulation der Granulozyten binden, was hier auch beobachtet werden konnte. Als Kontrolle wurde ein Peptid mit fast denselben Aminosäuren aber permutierter Sequenz verwendet, welches ebenfalls keine Bindung gegenüber den Leukozyten aufweist; $n=3-6 \pm$ SD für alle Messpunkte.

7.2.1.1 Bindungsnachweis von NG2 an humane Granulozyten nach Myokardinfarkt

Im Zuge einer Immunzellaktivierung kommt es zu einer deutlich veränderten Oberflächenexpression von Rezeptoren, die Einfluss auf die Bindungseigenschaften von NG2 nehmen kann. Daher wurde daraufhin die Bindung des NG2 in Blutproben von Patienten 12-24 Stunden nach einem ST-

Hebungsinfarkt (STEMI = *ST-elevated myocardial infarction*) untersucht, der bekanntermaßen zu einer massiven Aktivierung von Immunzellen führt. Dabei konnte ein mehr als doppelt so starkes Fluoreszenzsignal als in gesunden Kontrollen detektiert werden (Abbildung 7.18 A). Interessanterweise wurde bei der absoluten Zellzahl, die positiv für das Peptid ist, kein Unterschied zwischen gesunden und Myokardinfarktproben festgestellt. Bei beiden Gruppen banden ca. 50% der Granulozyten das Peptid (Abbildung 7.18 B).

Um zu untermauern, dass die verstärkte Bindung des Peptids an Granulozyten von Infarktpatienten auf deren Aktivierung zurückzuführen ist, wurden in separaten Experimenten Granulozyten von gesunden Probanden mit 1 µg/ml LPS für 1 Stunde bei 37 °C aktiviert und anschließend mit 1 µg/ml des Peptids inkubiert. Als Kontrolle dienten Granulozyten desselben Donors ohne LPS-Aktivierung. Anschließend wurde die MFI und die Anzahl positiver Zellen für das Peptid durchflusszytometrisch analysiert. Normiert man die MFI der mit LPS aktivierten Granulozyten auf die Kontrollgranulozyten, zeigt sich im Mittel eine Erhöhung der MFI um 1,5 (Abbildung 7.18 C) – also vom Ausmaß deutlich unter dem STEMI-Effekt.

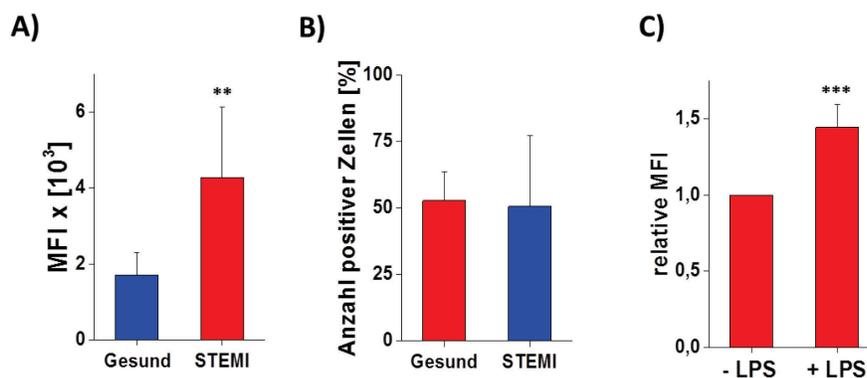


Abbildung 7.18: Bindung der Peptide an neutrophile Granulozyten von gesunden und STEMI Patienten.

Die Bindung des NG2 Peptids wurde auf humanen neutrophilen Granulozyten gesunder Donoren und Patienten nach einem STEMI (*ST-elevated myocardial infarction*) überprüft. **A)** Bei der MFI lässt sich ein Anstieg nach Myokardinfarkt messen; $n=6-9 \pm SD$ für alle Messpunkte. **B)** Hingegen konnte bei der Anzahl positiver Zellen für das Peptid kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ausgemacht werden; $n=6-9 \pm SD$ für alle Messpunkte. **C)** Aktiviert man Granulozyten gesunder Donoren für 1 Stunde bei 37 °C mit 1 µg/ml LPS und misst anschließend die MFI, zeigt sich eine um etwa 1,5 erhöhte MFI im Vergleich zu Granulozyten desselben Donors ohne LPS; $n=6 \pm SD$ für alle Messpunkte; *** = $p < 0,001$.

7.2.1.1.2 Internalisierungsnachweis von NG2 in humane Granulozyten nach STEMI

Ein wichtiges Kriterium für ein aktives Targeting von Zellen ist die nachfolgende Internalisierung des Rezeptors, um so sicherzustellen, dass die eingesetzten Kontrastmittel in die Zelle aufgenommen

werden und nicht im Laufe der Zeit durch die Scherkäfte im Blut wieder abgelöst werden. Daher wurde nach dem Nachweis der Bindung zusätzlich noch die Internalisierung der Peptide überprüft. Dazu wurde das NG2-Peptid an einen Farbstoff gekoppelt (*pH-Rodo Red*), dessen Fluoreszenz mit sinkendem pH-Wert stark zunimmt (siehe 6.3.2.4), um zu verfolgen, ob eine Aufnahme in saure Membrankompartimente, wie Endosom oder Lysosom, und somit eine Internalisierung erfolgt. Hierzu wurden isolierte Granulozyten von STEMI-Patienten zunächst bei 4° und 37 °C für 30 Minuten vorinkubiert, das NG2-pH-Rodo hinzugefügt und in definierten Zeitabständen die MFI durchflusszytometrisch ermittelt. Wie aus Abbildung 7.19 A ersichtlich ist, konnte bei 37 °C ein kontinuierlich zunehmendes Signal über die 60 Minuten ausgemacht werden (durchgängige Linie), wohingegen bei 4 °C nur ein leichter, initialer Anstieg der MFI zu verzeichnen war, die daraufhin eher dazu tendierte leicht abzunehmen (gestrichelte Linie). Die Bestimmung der *area-under-the-curve* macht die Unterschiede zwischen der 4 und 37 °C Inkubation noch deutlicher und ergab signifikant mehr Signal bei 37 °C (Abbildung 7.19 B), was eindeutig für eine energieabhängige Internalisierung des gesamten Konstrukts spricht.

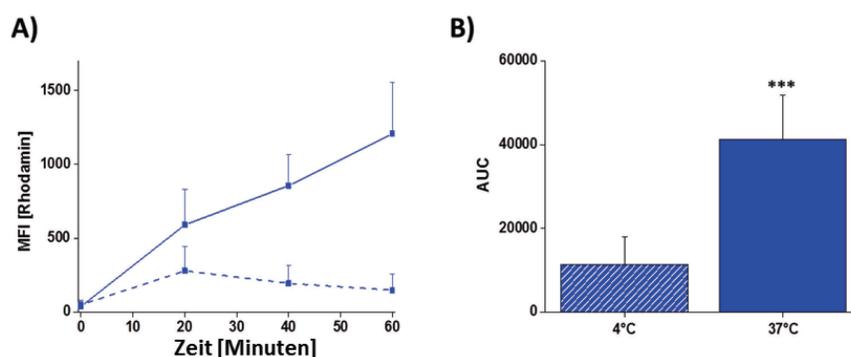


Abbildung 7.19: Internalisierungsnachweis mittels pH-Rodo Färbung.

A) Aufnahmekinetik von NG2, gekoppelt an pH-Rodo, in humane neutrophile Granulozyten bei 4 °C und 37 °C. Es lässt sich ein linearer Anstieg bei 37 °C verzeichnen (durchgezogene Linie), wohingegen bei der 4 °C Kontrolle nur initial ein schwacher Signalanstieg beobachtet wird (gestrichelte Linie). **B)** Die Auswertung der AUC zeigt signifikante Unterschiede zwischen der 4° und 37 °C Aufnahme der Peptide; n=9 ± SD für alle Messpunkte; *** = p<0,001

7.2.1.2 Identifizierung des Bindepartners von NG2

Wie bereits erwähnt, bindet das NG2 nur an ca. 50 % der Granulozyten, unabhängig, ob es sich um das Blut gesunder Probanden oder Proben nach einem Myokardinfarkt handelt. Um diese Subpopulation näher zu charakterisieren, sollte im nächsten Schritt der Bindepartner des Peptids auf diesen Zellen identifiziert werden. Herfür wurde ein kommerzielles Verfahren verwendet, das Liganden-Rezeptor-Targeting (LRC), das speziell dazu entwickelt wurde, um unbekannte Rezeptoren von Peptiden,

Antikörpern oder ähnlichen Strukturen auf Zellen zu identifizieren. Kernelement ist das *TriCeps*TM, das aus einer NHS-, einer Hydrazid- und einer Biotin-Gruppe besteht. Die NHS-Gruppe dient zur Verbindung des Peptids über ein primäres Amin (Abbildung 7.20 A). Bei Inkubation der Zellen mit dem gebildeten Komplex, bindet neben dem eigentlichen Peptid auch die Hydrazidgruppe und sorgt für eine verstärkte Assoziation an die Oberflächenproteine. Nach anschließender Zelllyse lassen sich die gebundenen Proteine über die Biotingruppe aufreinigen und durch Massenspektrometrie (MS) analysieren. Neben dem NG2-Peptid wurde noch ein weiteres Peptid mit gleicher Sequenz verwendet, bei dem aber in der Linkerregion eines der drei Glycine gegen ein Lysin ausgetauscht wurde (GGG bzw. GKG). Dieses beinhaltet eine freie Aminogruppe und soll so die Kopplungseffizienz an das *TriCeps*TM erhöhen. Als Negativkontrolle wurde statt der Peptide Transferrin an das *TriCeps*TM gebunden. Die analysierten MS-Daten sind in Abbildung 7.20 B in Form eines *volcano plot* dargestellt, wobei auf der X-Achse die Anreicherung der identifizierten Proteine und auf der Y-Achse der p-Wert des jeweiligen Proteins angegeben ist. Dabei konnte für beide Peptide CD177 als wahrscheinlichster Bindekandidat identifiziert werden. Demgegenüber konnte bei einem Vergleich beider Peptide kein Protein erkannt werden (Abbildung 7.20 B rechts).

Um CD177 als Bindepartner des NG2 zu validieren, wurden daraufhin humane neutrophile Granulozyten sowohl mit dem Peptid, als auch mit einem CD177-Antikörper für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Alle NG2⁺-Granulozyten zeigten auch eine Färbung gegen CD177, wohingegen die NG2⁻-Population dementsprechend kein CD177-Signal aufwies. Als weitere Kontrolle wurde Blut von einem Spender verwendet, von dem bekannt war, dass dessen Granulozyten kein NG2 binden. Hier konnte ebenfalls keine Bindung des CD177-Antikörpers festgestellt werden (Abbildung 7.20 C).

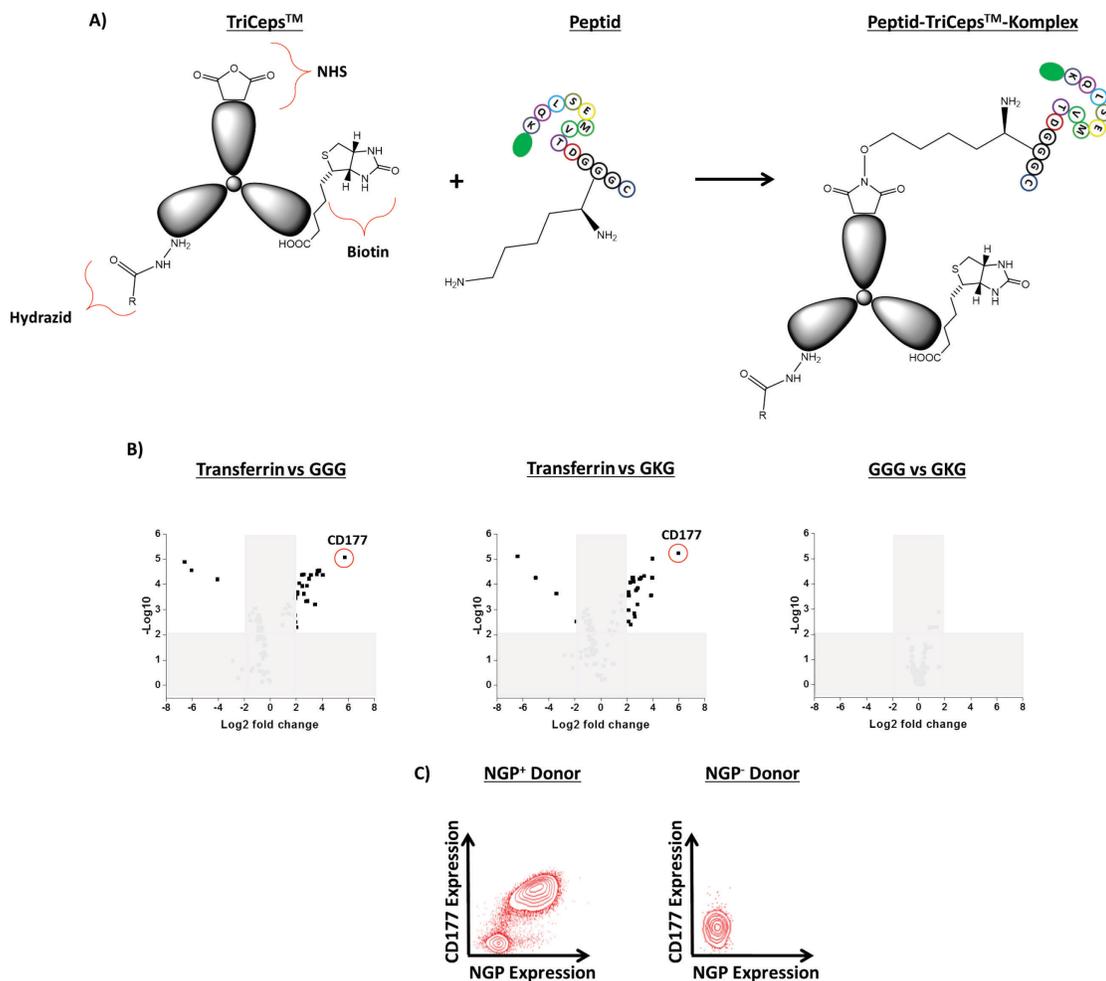


Abbildung 7.20: Identifikation des NG2-Bindepartners auf humanen neutrophilen Granulozyten.

A) Die Identifikation des Bindepartners von NG2 wurde in Kooperation mit DualsystemsBiotech vorgenommen. Die Peptide (NG2 mit GGG Spacer; NG2 mit GKG Spacer) wurden über eine NHS-Gruppe an *TriCeps™* gekoppelt und anschließend mit isolierten humanen Granulozyten inkubiert. Das Hydrazid des *TriCeps™* sorgt für eine verstärkte Bindung an die Oberflächenproteine. Anschließend kann die Probe über die Biotingruppe des *TriCeps™* aufgereinigt und die potenziellen Bindepartner mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. **B)** Gezeigt sind die MS-Analysen in einem *volcano plot*. Die Anreicherung der Proteine ist auf der X-Achse angegeben, die p-Werte der angereicherten Proteine auf der Y-Achse. Es wurden beide Peptide mit der Transferrinkontrolle verglichen, wobei sich als wahrscheinlichster Kandidat CD177 ergab. Beim Vergleich der beiden Peptide miteinander konnte kein einziges Protein identifiziert werden. **C)** Zur Validierung der MS-Daten wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Dazu wurden humane neutrophile Granulozyten mit NG2 und einem CD177 Antikörper bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend gemessen. Dabei konnte bei der NG2⁺-Population auch eine CD177-Expression gemessen werden, wohingegen bei der NG2⁻-Population auch kein CD177 zu messen war. Bei Verwendung eines Donors ohne Peptidbindung konnte ebenfalls keine CD177-Expression festgestellt werden.

7.2.1.3 Herstellung und Charakterisierung von ^{NG2}PFCs

Da das eigentliche Ziel des Zelltargetings die Detektion mittels ¹⁹F-MRT ist, wurde im nächsten Schritt NG2, sowie als Kontrollpeptid NGC an ^{Mal}PFCs gekoppelt (siehe 6.1.2.4). Wie oben dargestellt (Abb. 7.16) wurden die Peptide mit einem Cystein ausgestattet, dessen freie Sulfhydrylgruppe unter Reaktion mit Maleimid zur Kopplung an die Emulsion genutzt wurde. Die anschließende Charakterisierung der gebildeten ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs ergab vergleichbare Größen und Größenverteilungen auch im Hinblick auf ungekoppelte ^{Mal}PFCs (Abbildung 7.21). Das ζ-Potenzial nahm bei beiden Peptidgekoppelten Emulsionen im Vergleich zu den Ausgangs-PFCs leicht ab. Wie anhand der IVIS Messungen zu erkennen ist, kam es nach Kopplung und Aufreinigung der ^{NGC}PFCs und ^{NG2}PFCs nur zu einem leichten Verlust des Rhodaminsignals, dafür aber – aufgrund der über die Peptide eingeführten Cfl-Gruppe – erwartungsgemäß zu einem deutlich erhöhten FITC-Signal. Auch beim Fluorgehalt konnte zwischen den ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs kein großer Unterschied ausgemacht werden.

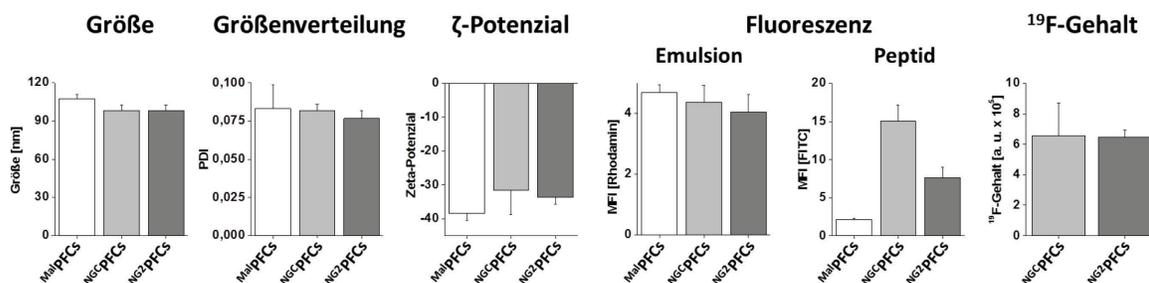


Abbildung 7.21: Charakterisierung der ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs.

Charakterisierung der ^{Mal}PFCs, sowie der ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs: Gemessen wurde die MFI, der Fluorgehalt, sowie Durchmesser, Größenverteilung und das ζ-Potenzials; n=6 ± SD für alle Messpunkte.

Zur Bestimmung des Liposomenanteils wurden erneut in Kooperation mit Wolfgang Krämer (Pharmazeutische Technologie Freiburg) Kryo-TEM-Aufnahmen von ^{NGC}PFCs und ^{NG2}PFCs erstellt. Wie bereits in 7.1.1.1 dargestellt, lassen sich hier leere Liposomen leicht von Emulsionspartikeln unterscheiden (Liposomen hell, Emulsionen dunkel), wodurch auf den Verunreinigungsgrad rückgeschlossen werden kann. Wie in Abbildung 7.22 zu erkennen, konnten sowohl in der ^{NGC}PFCs als auch der ^{NG2}PFCs nur ein sehr geringer Anteil an Liposomen ausgemacht werden (rote Pfeile).

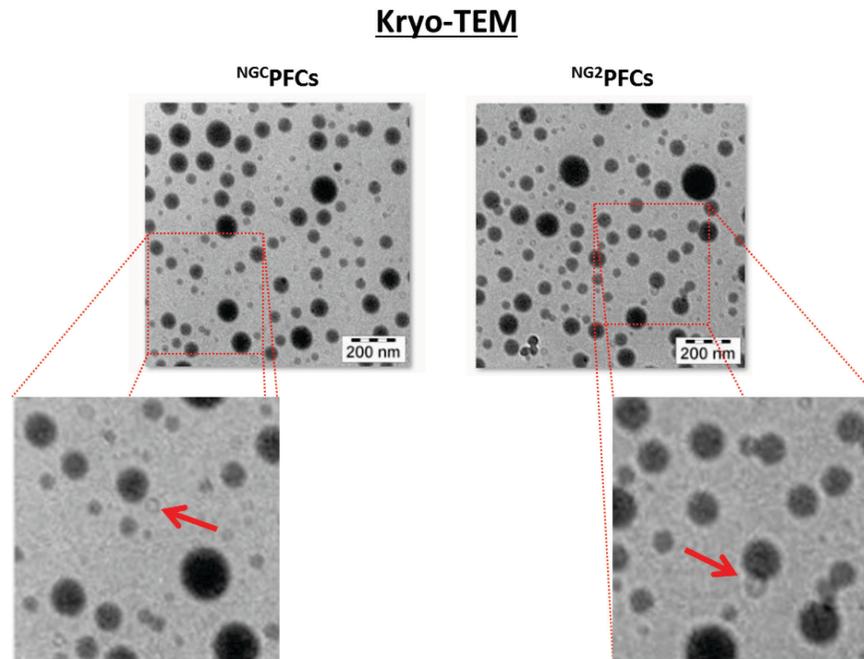


Abbildung 7.22: Kryo-TEM-Aufnahmen der ^{NGC}PFCs und ^{NG2}PFCs.

Es konnte nur ein sehr geringer Anteil an Liposomen in beiden Präparationen festgestellt werden (rote Pfeile).

7.2.1.4 Aufnahme der ^{NG2}PFCs in humane neutrophile Granulozyten

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass das freie Peptid NG2 spezifisch einen Teil der humanen neutrophilen Granulozyten bindet und daraufhin internalisiert wird. Im Folgenden wurde nun die Bindung und Aufnahme von ^{NG2}PFCs in humane Granulozyten untersucht.

7.2.1.4.1 Nachweis der Aufnahme von ^{NG2}PFCs mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde die Aufnahmekinetik der ^{NG2}PFCs in frisch isolierte Immunzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe 6.3.3.1): Die Zellen wurden dafür in 1 ml DMEM mit 10 μ l der ^{NG2}PFCs oder ^{NGC}PFCs bei 4 bzw. 37 °C inkubiert und anschließend zu definierten Zeitpunkten die Rhodamin- bzw. FITC-Fluoreszenz in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten bestimmt.

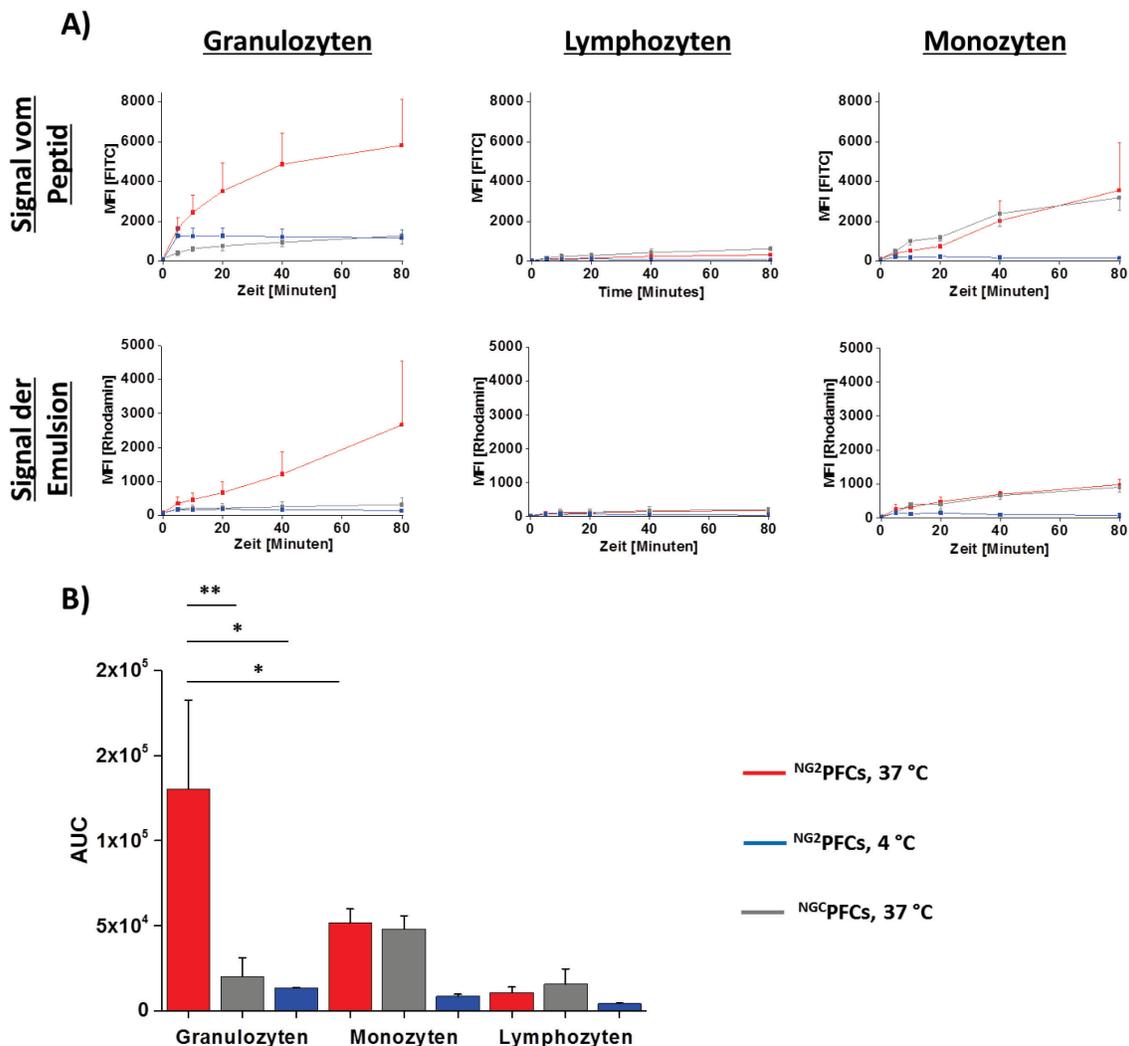


Abbildung 7.23: Aufnahme von ^{NG2}PFCs in humane neutrophile Granulozyten.

A) Durchflusszytometrische Analysen der Aufnahmekinetik von ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs in humane neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Die Immunzellen wurden mittels Erythrozytenlyse isoliert und anschließend mit den ^{NG2}PFCs bei 37 °C (rot) bzw. 4 °C (blau) und mit den ^{NGC}PFCs bei 37 °C (grau) über 80 Minuten hinweg inkubiert, wobei zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) eine Probe abgenommen und die Aufnahme der Emulsionen durchflusszytometrisch analysiert wurde. **B)** Auswertung der AUC (*Area-under-the-curve*). Dabei lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den Granulozyten inkubiert mit den ^{NG2}PFCs bei 37 °C sowie 4 °C ausmachen. Ebenso zeigen sich starke Unterschiede bei Verwendung der ^{NGC}PFCs. Zudem zeigen die Granulozyten deutlich mehr Signal bei der ^{NG2}PFC-Inkubation verglichen mit den Monozyten; n=8-9 ± SD für die 37 °C Messungen; n=3 ± SD für die 4 °C Messungen; * = p<0.05; ** = p<0,01.

Erhoffterweise führte dabei die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit ^{NG2}PFCs bei 37 °C zu einer starken Partikelaufnahme, wie aus der asymptotischen Steigerung des FITC-Signals und des eher linear zunehmenden Rhodamin-Signals zu erkennen ist. Demgegenüber resultierte die Exposition

dieser Zellen bei 4 °C zwar in einer initialen Oberflächenbindung (deutliche FITC-Zunahme), die aber keine nennenswerten Internalisierung zur Folge hatte (stabiles FITC- und Rhodamin-Signal im weiteren Beobachtungszeitraum; Abb. 7. 23, links). Auch die Inkubation mit ^{NGC}PFCs bewirkte ganz ähnliche Effekte wie ^{NG2}PFCs bei 4 °C, sowohl beim FITC als auch beim Rhodamin, die auf keine substantielle Inkorporation dieser Kontrollemulsion hindeutete. Im Vergleich dazu zeigten Monozyten (Abb. 7.23, Mitte) eine deutlich langsamere und auch geringere Aufnahme von ^{NG2}PFCs bei 37 °C, die etwa ein Drittel des Granulozytenwerts entsprach und sich durch Temperatursenkung auf 4 °C fast völlig unterdrücken ließ. Da ^{NGC}PFCs ein fast deckungsgleiches Aufnahmemuster wie ^{NG2}PFCs bei 37 °C aufwiesen, ist die Partikelinkorporation hier in beiden Fällen offenbar auf unspezifische Phagozytose durch die Monozyten zurückzuführen. Demgegenüber war bei Lymphozyten für alle Emulsionen bei beiden Temperaturen nur eine marginale Aufnahme zu beobachten (Abb. 7.23, rechts).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die oben beschriebene stärkere Bindung des NG2 an Granulozyten von Patienten nach Myokardinfarkt (Abb. 7.18), auch zu einer erhöhten Aufnahme von ^{NG2}PFCs führt. Hierzu wurden wiederum Immunzellen von STEMI-Patienten mit denen gesunder Probanden verglichen. Wie aus Abbildung 7.24 ersichtlich ist, zeigten die Granulozyten der STEMI-Patienten bei Inkubation mit ^{NG2}PFCs eine nahezu lineare Zunahme der MFI (blaue Linie), die die Werte gesunder Spender (rote Linie) zu jedem Zeitpunkt deutlich überstieg und am Ende fast um Faktor 3 höher war. Hingegen konnte bei Verwendung der ^{NGC}PFCs in beiden Gruppen so gut wie keine PFC-Internalisierung detektiert werden (blau/rot gestrichelte Linien). Auch hier ließ sich bei den Monozyten eine gewisse Aufnahme von ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs beobachten, die zum einen aber deutlich geringer war als bei den Granulozyten und zum anderen in beiden Gruppen ähnlich ausfiel, d.h. dass der Infarkt zu diesem frühen Zeitpunkt (12-24 Stunden post STEMI) offenbar noch keine Auswirkungen auf die Phagozytoseeigenschaften der Monozyten hat. Lymphozyten schließlich zeigten für alle PFCs extrem geringe Fluoreszenzsignale, sowohl von gesunden Spendern als auch von Infarktpatienten.

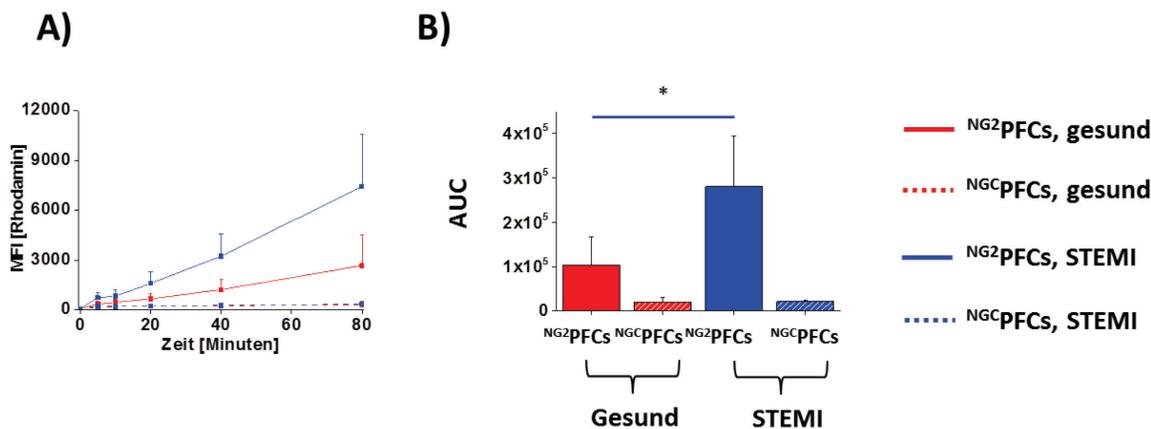


Abbildung 7.24: Vergleich von gesunden und STEMI-Blutproben bezüglich der Aufnahme von ^{NG2}PFCs.

Aufnahme von ^{NG2}PFCs und ^{NGC}PFCs von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von gesunden Spendern und von Patienten 12-24 Stunden nach STEMI (*ST-elevated myocardial infarction*). Isolierte Immunzellen wurden mit ^{NG2}PFCs bzw. ^{NGC}PFCs bei 37 °C über 80 Minuten hinweg inkubiert, wobei zu definierten Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 40, 80 Minuten) Proben abgenommen und die Aufnahme der Emulsionen in die Zellen durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Bei STEMI ist eine deutlich stärkere Aufnahme der ^{NG2}PFCs im Vergleich zu den gesunden Proben, bei den Kontrollemlusionen hingegen kein Unterschied erkennbar. Auch die anderen Leukozytenpopulationen zeigen keine Unterschiede zwischen gesund und STEMI (Daten nicht gezeigt); n gesund = 8-9, n STEMI = 5-7; * = p<0,05.

7.2.1.4.2 Endozytoseeigenschaften von Granulozyten gesunder Probanden und STEMI-Patienten

Um auszuschließen, dass die verstärkte Aufnahme der ^{NG2}PFCs nach STEMI lediglich auf eine erhöhte Endozytosekapazität infolge einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch den Infarkt zurückzuführen ist, wurde zudem ein Phagozytoseassay mit gesunden und STEMI-Blutproben durchgeführt (Abbildung 7.25, obere Reihe). Dazu wurden isolierte Granulozyten mit normalen ‚nicht-getargeteten‘ ^{Cf}PFCs inkubiert und deren passive Aufnahme über die Zeit durchflusszytometrisch überprüft (siehe 6.3.4.1). Dabei konnte sowohl bei gesunden als auch bei STEMI-Proben ein kontinuierlicher Anstieg der MFI über die 80 Minuten hinweg festgestellt werden, wobei sich allerdings keine Unterschiede in der Aufnahme der nicht-spezifischen PFCs durch die jeweiligen Granulozyten ergaben.

Darüber hinaus wurde noch ein standardisierter Endozytoseassay unter Verwendung von FITC-konjugierter Dextranpartikel mit 10.000 kD – dies entspricht etwa 1,5 nm – durchgeführt.^{135–139} Hierfür wurden 1x10⁶ isolierte Granulozyten in 1 ml PBS mit 50 µg/ml Dextranpartikel über 30 Minuten inkubiert und nach jeweils 10 Minuten die MFI bestimmt (Abbildung 7.25, untere Reihe). Auch bei diesem Assay zeigten die Proben von gesunden Probanden und STEMI-Patienten sehr ähnliche Aufnahmekinetiken. Beide steigen über die 30 Minuten hinweg kontinuierlich an, wobei der Anstieg in

den ersten 10 Minuten am stärksten ausfällt. Die Bestimmung der AUC ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen für die Endozytose der Dextranpartikeln, wenngleich die STEMI-Proben einen tendenziell höheren Wert aufweisen.

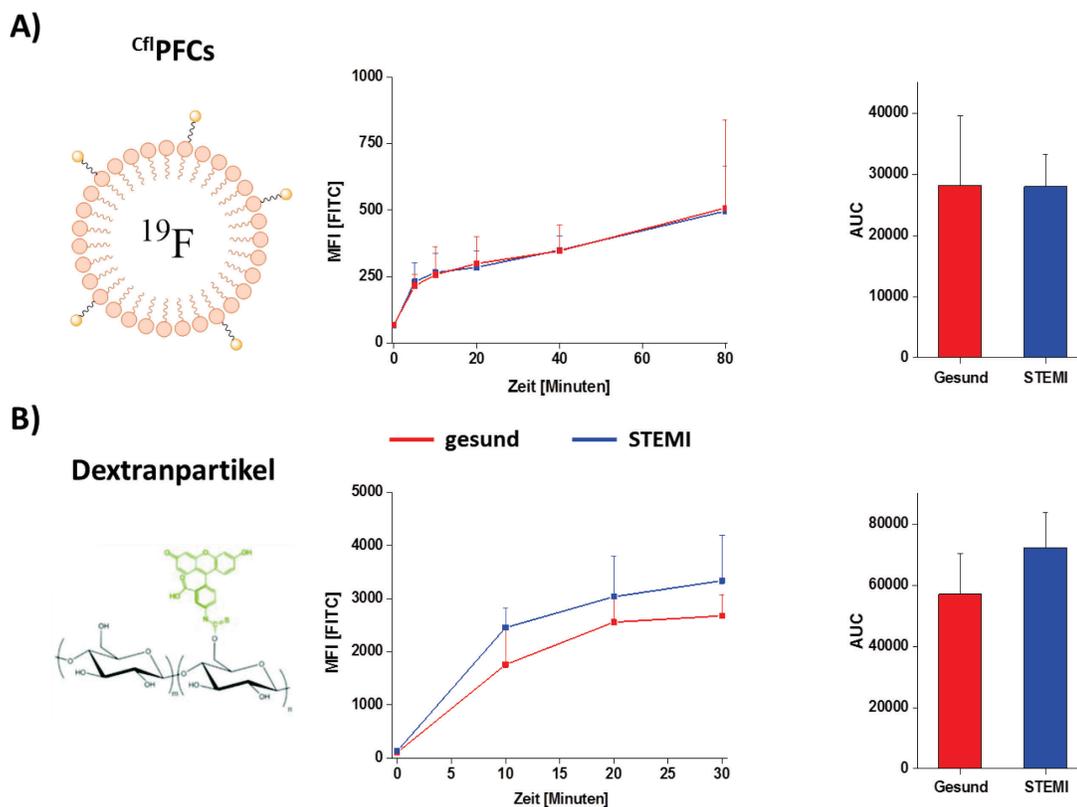


Abbildung 7.25: Kein Unterschied in der Endozytose zwischen Gesunden und STEMI.

A) Links dargestellt sind die verwendeten ^{19}F PFCs mit den FITC-konjugierten Lipiden (gelbe Punkte). Mittig ist ein Vergleich von gesunden Proben und Proben von Patienten 12-24 Stunden nach STEMI bezüglich der Aufnahme von ^{19}F PFCs gezeigt. Die Zellen wurden über 80 Minuten hinweg mit den Partikeln inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden Proben entnommen und die MFI durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei lässt sich bei Auswertung der AUC (rechts) kein Unterschied zwischen den gesunden Proben und den von STEMI (*ST-elevated myocardial infarction*) Patienten ausmachen. **B)** Links sind schematisch die eingesetzten FITC-konjugierten 10.000 kDa Dextranpartikel gezeigt. In der Mitte ist die Aufnahme der Dextranpartikel in die Granulozyten gesunder Probanden und STEMI-Patienten über einen Zeitraum von 30 Minuten hinweg gezeigt. Dafür wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten (0; 10; 20; 30 Minuten) Proben entnommen und diese durchflusszytometrisch untersucht. Bei der Auswertung der AUC (rechts) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, auch wenn hier die STEMI Proben etwas erhöhte Werte aufweisen; $n=5 \pm \text{SD}$ für A) und $n=4 \pm \text{SD}$ für B).

7.2.1.4.3 Inhibition der Aufnahme durch Vorinkubation mit NG2

Im nächsten Schritt wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt (siehe 6.3.3.2), um nachzuweisen, dass die Aufnahme der ^{19}F PFCs durch humane Granulozyten im Wesentlichen durch die Bindung des NG2-Peptid vermittelt wird. Dazu wurden die Granulozyten zur Blockade der NG2-Bindestellen 30

Minuten bei 4 °C mit einem Überschuss an NG2 (5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden ^{NG2}PFCs hinzugefügt und die Zellen für weitere 80 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) wurden Proben abgenommen und die Aufnahme der Emulsionen in die Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Peptid bei 4 °C vorinkubiert und anschließend die Aufnahme der Emulsionen bestimmt.

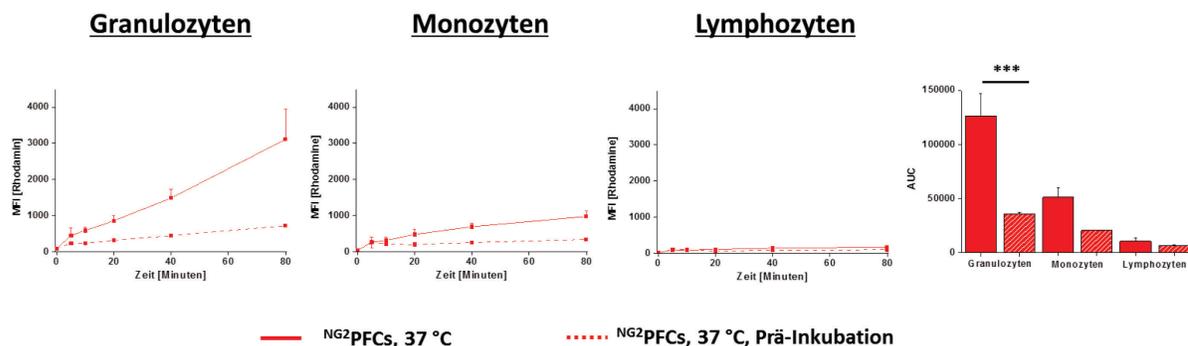


Abbildung 7.26: Hemmung der ^{NG2}PFC-Aufnahme durch Vorinkubation mit NG2.

Humane neutrophile Granulozyten wurden mit 5 µg/ml NG2 bei 4 °C für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend bei 37 °C mit 10 µl ^{NG2}PFCs inkubiert. Die Aufnahme der Emulsion wurde über einen Zeitraum von 80 Minuten untersucht, wobei zu definierten Zeitpunkten (0; 5; 10; 20; 40; 80 Minuten) eine Probe abgenommen und die Aufnahme der ^{NG2}PFCs durchflusszytometrisch bestimmt wurde; n=3-4 ± SD für alle Messpunkte; *** = p<0,001

In Abbildung 7.26 sind jeweils das Rhodamin-Signal der Emulsion ohne vorherige Peptidinkubation (rote durchgezogene Linie) bzw. nach Vorinkubation mit NG2 (gestrichelte Linie) zu sehen. Wie klar zu erkennen, wurde das Rhodamin-Signal in den Granulozyten durch die Vorinkubation deutlich vermindert. Die Auswertung der AUC belegt die deutliche Hemmung der ^{NG2}PFC-Aufnahme durch NG2-Vorinkubation, was klar für die NG2-Abhängigkeit der Partikelinternalisierung spricht.

7.2.1.4.4 Mikroskopische Aufnahmen von Granulozyten nach ^{NG2}PFC- oder ^{NGC}PFC-Inkubation

Um die Integrität der Emulsionspartikel nach deren Inkorporation zu überprüfen, wurden mikroskopische Aufnahmen von neutrophilen Granulozyten durchgeführt, welche mit ^{NG2}PFCs bzw. ^{NGC}PFCs inkubiert worden sind. Bei Verwendung der ^{NG2}PFCs ließ sich hierbei eine deutliche Färbung der neutrophilen Granulozyten sowohl im Rhodamin-, als auch im FITC-Kanal erkennen (Abb. 7.27 oben) mit Kolokalisation von FITC- und Rhodaminsignal (gelber Pfeil).

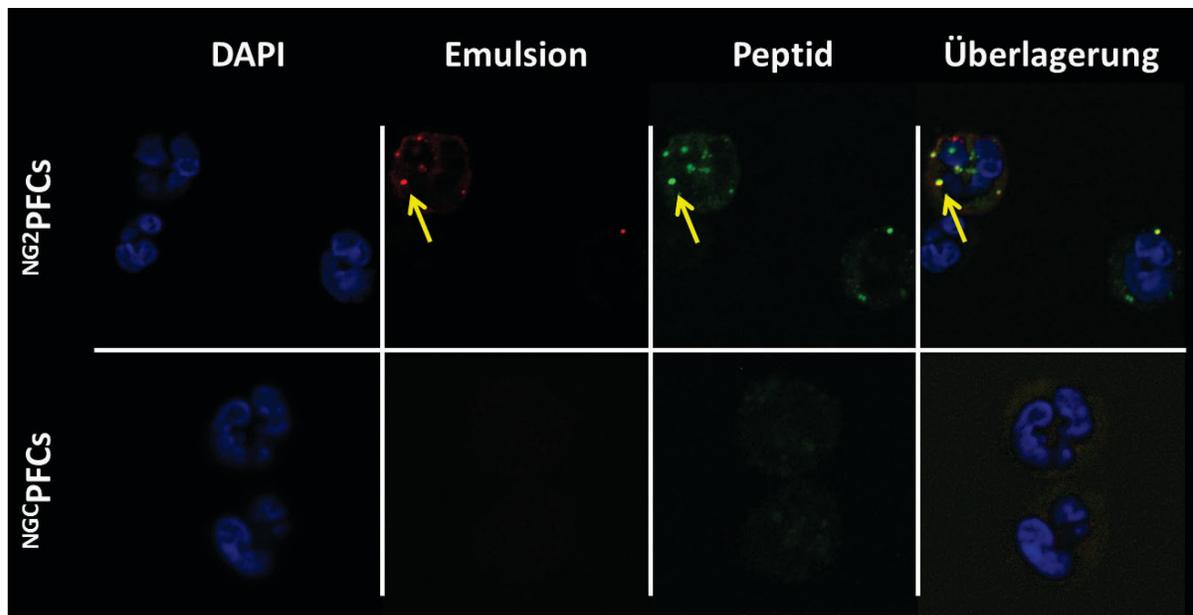


Abbildung 7.27: Mikroskopische Aufnahmen von Granulozyten nach Internalisation von NG2 PFCs und NGC PFCs.

Neutrophile Granulozyten wurden mit den NG2 PFCs bzw. NGC PFCs inkubiert, anschließend gewaschen, fixiert und eingedeckelt. Das NG2-/NGC-Peptid enthält FITC und die Lipidhülle der PFCs Rhodamin um die Partikel über Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Die Zellkerne sind mittels DAPI (blau) dargestellt. Bei den NG2 PFCs lassen sich punktuelle FITC-positive Vesikel in den Zellen erkennen, die ebenfalls Rhodamin-Signal enthalten (gelber Pfeil). Neutrophile, die mit NGC PFCs inkubiert wurden, zeigen weder FITC- noch Rhodamin-Signal.

Allerdings weisen nicht alle Zellen Fluoreszenzfärbungen auf, was im Einklang mit obigen Expressionsstudien steht (Abb. 7.17), die zeigte dass nur etwa 50-60% der Granulozyten NG2 exprimieren. In den Zellen, welche mit den NGC PFCs behandelt wurden, ließ sich hingegen nur eine Hintergrundfärbung erkennen (Abb. 7.27 unten).

7.2.1.4.5 Nachweis der NG2 PFC-Aufnahme mittels ^{19}F -MRT

Nachdem die Spezifität des NG2-Peptides und die Internalisation von NG2 PFCs in neutrophile Granulozyten demonstriert werden konnte, sollte nun überprüft werden, inwieweit es möglich ist, dies auch mittels ^{19}F -MRT zu visualisieren. Hierfür wurden Immunzellen von gesunden Probanden isoliert und anschließend in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt. Der eine Teil wurde über Nacht mit NG2 PFCs, der andere mit der Kontroll-emulsion (NGC PFCs) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und im MRT gemessen. Wie zuvor ließen sich die Zellschichten innerhalb des Dichtegradienten durch T2-gewichtete ^1H -MRT sichtbar machen und im

ortskorrespondierenden ^{19}F -MRT-Bild konnte bei Inkubation mit NG^2PFCs ein starkes Fluorsignal detektiert werden, wohingegen für NGC^{PFCs} nur ein schwaches Signal erkennbar war (Abb. 7.28 A). Letzteres ist sicherlich im Wesentlichen auf die Anwesenheit der Monozyten in der Immunzellfraktion zurückzuführen. Dennoch ergab die Auswertung des Gesamtfluorgehaltes ein signifikant erhöhtes ^{19}F -Signal in den NG^2PFC -Proben.

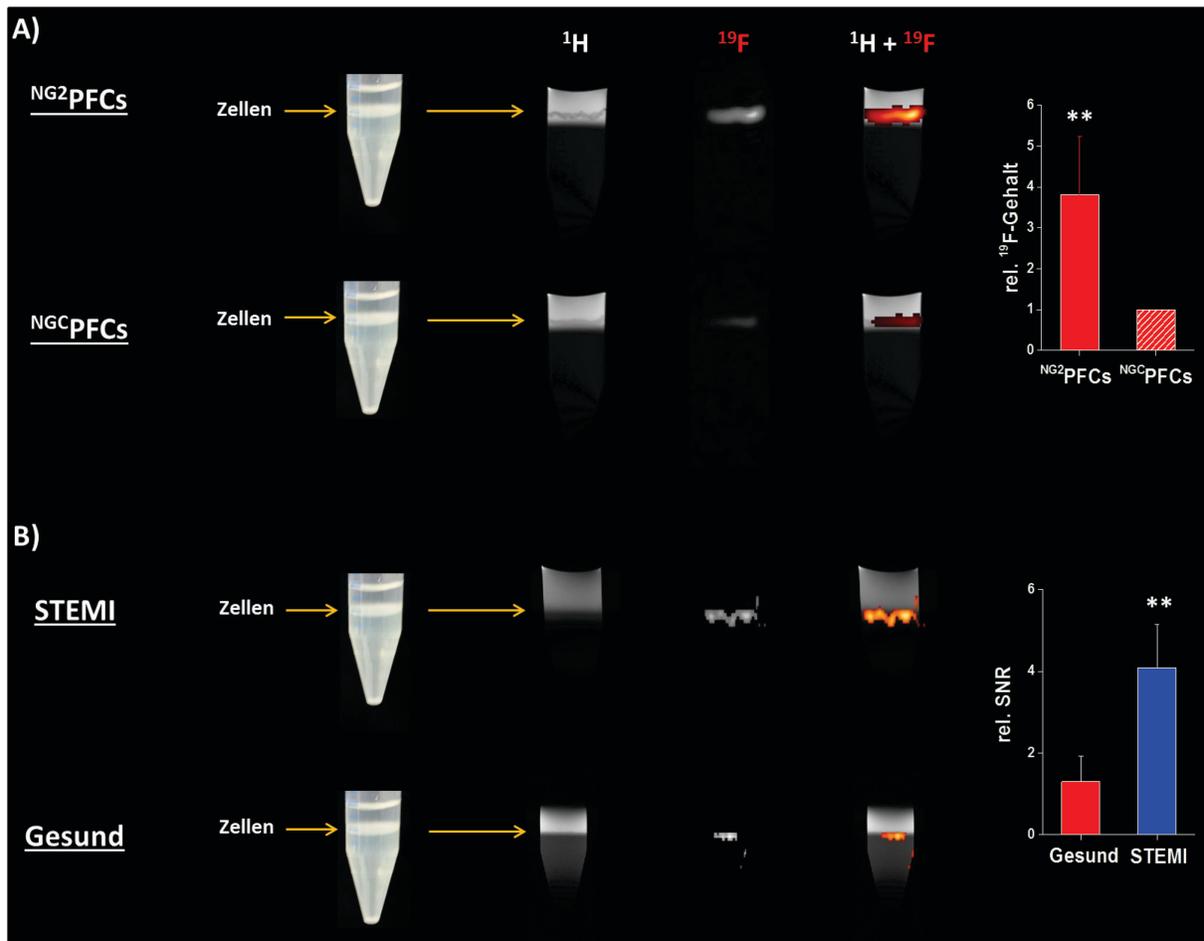


Abbildung 7.28: ^{19}F -Bildgebung von neutrophilen Granulozyten.

A) Isolierte Immunzellen wurden über Nacht mit NG^2PFCs bzw. NGC^{PFCs} inkubiert und am folgenden Tag nach mehrmaligem Waschen über einen Dichtegradienten aufgetrennt. Durch eine T2-gewichtete RARE-Sequenz lässt sich im MRT die Zellschicht darstellen. Das ^{19}F -Signal wurde durch eine ^{19}F -RARE-Sequenz visualisiert und lässt sich eindeutig in den Granulozyten erkennen. Rechts: Quantitative Auswertung des ^{19}F -Signals; MW \pm SD von $n=6$ für alle Messpunkte; ** = $p<0,01$ **B)** Isolierte neutrophile Granulozyten von Gesunden oder Patienten mit STEMI (*ST-elevated myocardial infarction*) (5×10^6) wurden mit NG^2PFCs für 5 Stunden inkubiert, freie PFCs durch Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen über einen Dichtegradienten aufgetrennt und im MRT untersucht. Neutrophile Granulozyten aus STEMI-Patienten zeigten dort im Schnitt ein mehr als doppelt so starkes Signal wie die gesunden. SNR gesund: $1,3 \pm 0,63$; SNR STEMI: $4,08 \pm 1,04$. $n=5-6 \pm$ SD für alle Messpunkte; ** = $p<0,01$.

Daraufhin sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich auch die mittels Durchflusszytometrie beobachtete stärkere Bindung des NG2 bzw. der ^{NG2}PFCs nach Myokardinfarkt mit ¹⁹F-MRT bestätigen lässt. Dazu wurden hier isolierte Granulozyten (5×10^6) von gesunden Probanden und STEMI-Patienten für 5 Stunden mit ^{NG2}PFCs inkubiert, nach anschließendem Waschen mittels Dichtegradient aufgetrennt und in den MRT überführt. Wie in Abbildung 7.28 B klar zu sehen, wiesen Granulozyten von STEMI-Patienten ein deutlich stärkeres ¹⁹F-Signal auf, als es bei den Gesunden der Fall ist. Die quantitative Auswertung zeigte einen mehr als doppelt so hohen Fluorgehalt in Granulozyten nach Infarkt im Vergleich zur Kontrolle, was sich in guter Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Fluoreszenzdaten befindet (Abb. 7.24).

7.2.1.5 Einfluss von NG2 auf Vitalität und Aktivität humaner Granulozyten

Um auszuschließen, dass die Bindung der ^{NG2}PFCs an CD177 bzw. deren anschließende Internalisierung die Zielzelle durch Induktion von Signalkaskaden beeinflusst, wurden danach die Auswirkungen der ^{NG2}PFCs auf Zellvitalität und/oder -aktivität überprüft. Dazu wurde die Oberflächenexpression verschiedener Aktivierungsmarker (CD11b, CD63 und CD66b), die Freisetzung von ROS sowie die Migration neutrophiler Granulozyten mit und ohne ^{NG2}PFCs verglichen.

Für Ersteres wurden isolierte Granulozyten 1 Stunde mit ^{NG2}PFCs inkubiert, als Positivkontrolle mit 1 µg/ml LPS stimuliert und als Negativkontrolle nur in DMEM inkubiert. Nach 1x Waschen wurden die entsprechenden Färbungen durchgeführt, anschließend durchflusszytometrisch die MFI bestimmt und jeweils auf die Negativkontrolle normiert. Dabei konnte bei Inkubation mit ^{NG2}PFCs für keinen der drei Marker eine Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden (Abbildung 7.29 A). Demgegenüber führte die Positivkontrolle LPS zur Expressionserhöhung aller Marker, wobei lediglich für CD63 nicht das Signifikanzniveau erreicht wurde.

Die Analyse der ROS-Produktion wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Engel (Abteilung für Immundynamik, Essen) durchgeführt. Dazu wurden isolierte Granulozyten über 24 Stunden hinweg in DMEM mit NG2, ^{NG2}PFCs, NGC, ^{NGC}PFCs und, als Kontrolle, ohne alles inkubiert und nach 1, 3, 6 und 24 Stunden Proben aus dem Überstand entnommen. Wie aus Abbildung 7.29 B ersichtlich ist, konnte in keinem der Ansätze im Vergleich zur Kontrolle (schwarze Linie) eine erhöhte ROS-Produktion ausgemacht werden. Bei allen wurde ein Wert von ca. 1500 nM ermittelt.

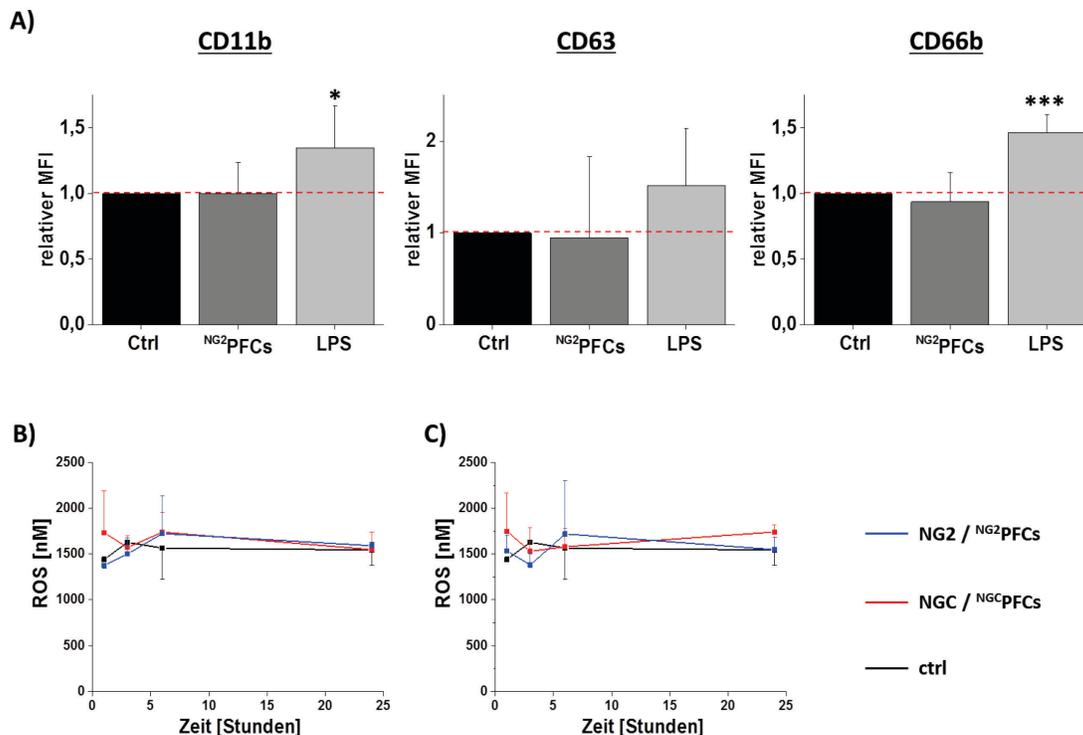


Abbildung 7.29: NG²PFCs induzieren keine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.

A) Oberflächenexpression von CD11b, CD63 und CD66b nach Inkubation der Granulozyten in reinem DMEM, mit NG²PFCs (10 µl/ml) und mit LPS (1 µg/ml). Die Fluoreszenzwerte wurden auf die Negativkontrolle normiert; n=8 ± SD für alle Messpunkte; * = p<0,05; *** = p<0,001. **B)** ROS-Assay zur Überprüfung der Aktivität von neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit NG2, NGC bzw. als Kontrolle nur in DMEM. Wie zu erkennen, konnte bei beiden Peptiden eine ähnliche Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über die 24 Stunden hinweg gemessen werden wie in der Kontrolle. **C)** ROS-Assay zur Überprüfung der Aktivität von neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit NG²PFCs, NGC^CPFCs, bzw. als Kontrolle nur in DMEM. Wie zu erkennen, konnte bei beiden Emulsionen eine ähnliche Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über die 24 Stunden hinweg gemessen werden wie in der Kontrolle; n=3 ± SD für alle Messpunkte.

Zur Überprüfung, ob eine Beladung mit den Emulsionen die Migration der Granulozyten verändert, wurden Granulozyten zunächst in unterschiedlicher Zelldichte für 1 Stunde mit NG²PFCs in DMEM inkubiert (bzw. als Kontrolle nur in DMEM). Nach ausgiebigem Waschen wurden die Zellen für 1 Stunde in Migrationskammern mit Thincert-Einsätzen (Porendicke 3 µm) und 100 ng/ml IL-8 als Chemoattraktant^{140,141} eingebracht. Danach wurde der Anteil an migrierten Granulozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Wie in Abbildung 7.30 zu erkennen, konnte kein nennenswerter Effekt der NG²PFCs auf die Anzahl migrierter Zellen ausgemacht werden. Unabhängig von der Zelldichte migrierten sowohl mit, als auch ohne PFC-Beladung im Schnitt 25-30 % der Granulozyten.

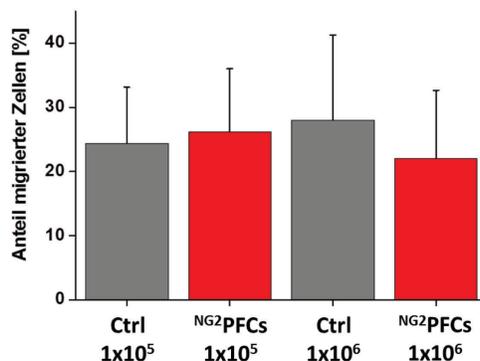


Abbildung 7.30: Einfluss der PFC-Beladung auf die Migration von Granulozyten bei unterschiedlicher Zelldichte.

Dargestellt ist der Einfluss einer Vorbehandlung mit den NG2 PFCs auf die IL8-vermittelte Migration von humanen neutrophilen Granulozyten. Humane Granulozyten wurden 1 Stunde mit NG2 PFCs bzw. als Kontrolle nur in DMEM inkubiert. Anschließend wurde die Migration der Zellen in einer Transwell-Kammer untersucht. Um zu überprüfen, ob die Zelldichte Einfluss nimmt, wurden zudem einmal 1×10^5 bzw. 1×10^6 Granulozyten für den Migrationsassay eingesetzt; $n=4 \pm SD$ für alle Messpunkte.

7.2.1.6 Einfluss des STEMI auf die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Zum Abschluss dieses Themenkomplexes wurde noch untersucht, inwieweit STEMI die Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten verändert. Da einer der wichtigsten Aufgaben von Granulozyten das rasche Einwandern in inflammatorische Bereiche ist, um dort eventuelle Pathogene zu beseitigen,^{9,26} wurden zunächst die Migrationseigenschaften von Granulozyten gesunder Probanden mit denen von STEMI-Patienten verglichen.

7.2.1.6.1 Migrationsassay

Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau wie im vorherigen Kapitel beschrieben verwendet, nur dass drei unterschiedliche Konzentrationen des Chemokins IL-8 eingesetzt wurden (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). Zudem wurde der Anteil an migrierten Granulozyten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (1 und 3 Stunden) ermittelt. In Abbildung 7.32 sind die aus diesen Experimenten erhaltenen Daten zusammengefasst. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Chemokin-induzierte Migration der Granulozyten nach STEMI in jederlei Hinsicht deutlich stärker ausfiel als im Normalfall – sowohl in Abhängigkeit von IL-8-Konzentration und als auch über die Zeit (Abbildung 7.31 A+B): Zu jedem Messzeitpunkt und Chemokinpiegel war die Migrationsantwort in der STEMI-Gruppe mindestens doppelt so hoch wie bei gesunden Probanden.

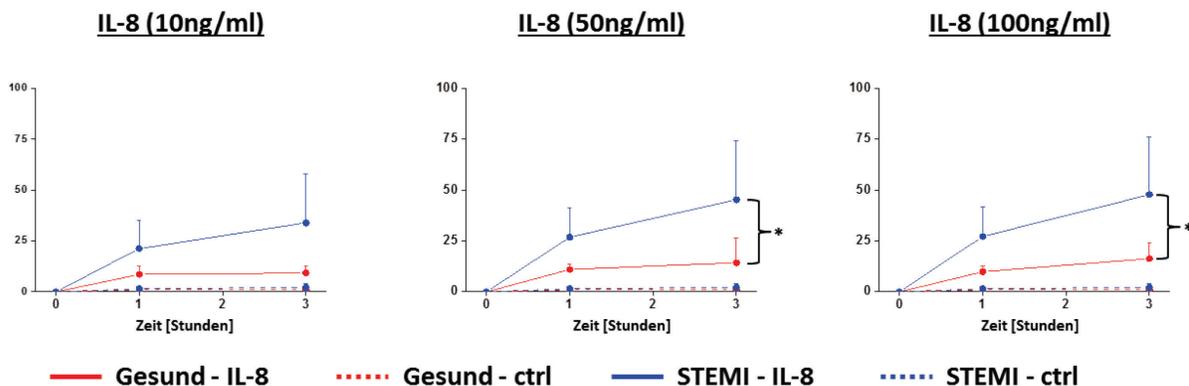


Abbildung 7.31: Migration von neutrophilen Granulozyten.

Migration von neutrophilen Granulozyten aus gesunden Spendern und von Patienten 12-24 Stunden nach einem Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung (STEMI). Ermittelt wurde der Anteil an migrierten Granulozyten nach 1 und 3 Stunden durch die Filtermembran in Abhängigkeit unterschiedlicher IL-8-Konzentrationen. Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen eingesetzt. $n=6-7 \pm SD$ für alle Messpunkte; * = $p < 0,05$.

7.2.1.6.2 Expression von CXCR1/2

Da die obigen Ergebnisse eindeutig belegen, dass Granulozyten von Infarktpatienten verstärkt auf IL-8 reagieren, wurde im Folgenden die Oberflächenexpression der beiden Rezeptoren für IL-8 überprüft. Dabei handelt es sich um CXCR1 oder CXCR2, wobei die primäre IL-8-Bindung an CXCR1 erfolgt, welcher dann im Wesentlichen für die Induktion der Chemotaxis verantwortlich ist.³²⁻³⁴ Zur Expressionsanalyse wurden isolierte Granulozyten für 30 Minuten bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Aus diesen Messungen ergab sich eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression von CXCR1 und eine tendenziell erhöhte Expression von CXCR2 auf Granulozyten von Patienten nach einem Myokardinfarkt gegenüber gesunden Spendern (Abbildung 7.32 A+B).

Zusätzlich wurde die daran nachgeschaltete Signalkaskade beider Rezeptoren untersucht. Bei CXCR1 und CXCR2 handelt es sich in beiden Fällen um GPCRs (*g-protein coupled receptors*), woraufhin nach Aktivierung die G_α -Untereinheit über PKA die MAPK aktiviert, was am Ende in einer Phosphorylierung von ERK1/ERK2 resultiert. Die $G_{\beta,\gamma}$ -Untereinheit sorgt dabei zum einen über IP3 für eine Degranulation und zum anderen über die PKC auch für phosphoryliertes ERK1/ERK2. Daher wurde als *readout* zur Aktivierung dieser Kaskade der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/ERK2 im Lysat von Granulozyten gesunder Probanden und Patienten nach Myokardinfarkt mittels ELISA miteinander verglichen (siehe 6.3.5.2). Dabei konnte tatsächlich festgestellt werden, dass Granulozyten nach einem STEMI im Vergleich zu gesunden Donoren eine massiv erhöhte Menge an

phosphoryliertem ERK1/ERK2 aufwies (Abbildung 7.32 C), was klar für eine bedeutende Rolle dieses Signalwegs bei der Migration der Granulozyten nach Myokardinfarkt spricht.

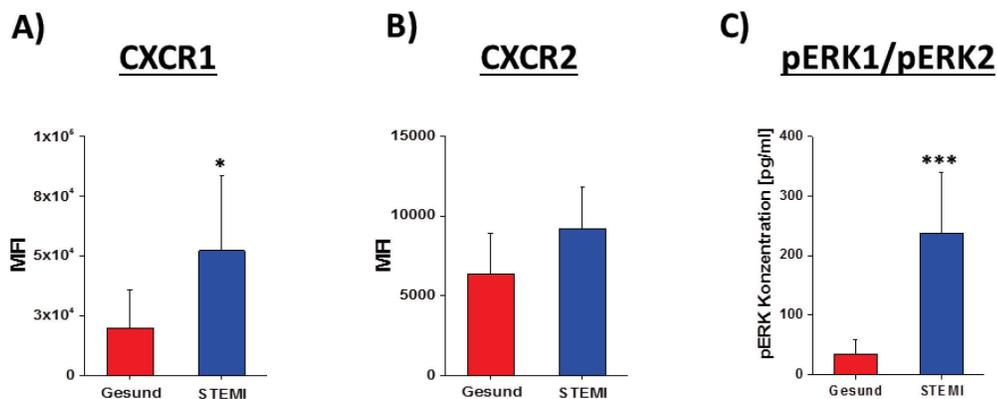


Abbildung 7.32: Untersuchung der migrationsabhängigen Rezeptorexpression sowie Signalkaskade.

A + B) Oberflächenexpression von CXCR1 und CXCR2 auf Granulozyten von gesunden Donoren sowie Patienten nach einem Myokardinfarkt. Es konnte eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression des CXCR1 und eine tendenziell erhöhte Oberflächenexpression des CXCR2 bei den Granulozyten nach Myokardinfarkt gegenüber den gesunden Spendern festgestellt werden. $n = 4-7 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte **C)** Angabe der Menge an gemessenem phosphoryliertem pERK1 und pERK2 im Lysat von Granulozyten Gesunder und Myokardinfarktpatienten. Wie zu erkennen, konnte eine signifikant erhöhte Menge an pERK1/pERK2 bei den Infarktpatienten festgestellt werden, verglichen mit den Gesunden; $n=7-8 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

7.2.2 Aufbau und Etablierung eines Cargo-Internalisierungs-Rezeptor-Systems (CIR)

In parallelen Untersuchungen wurde ein völlig alternativer Ansatz für ein aktives Targeting von Immunzellen mithilfe eines artifiziellen Cargo-Internalisierungs-Rezeptor-Systems (CIR) etabliert (Abbildung 7.33). Die CIRs wurden in Kooperation mit Mitarbeitern der AG von Prof. Dr. Scheller im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hergestellt. CIRs bestehen extrazellulär aus einem GFP-Nanobody, welcher hochspezifisch an GFP bindet¹⁴². Darauf folgt ein kurzer Spacer, welcher in die Transmembrandomänen (TMDs) übergeht und schließlich eine kurze intrazellulär vorliegende C-terminale Domäne (CTD). Insgesamt wurden drei CIRs generiert, die unterschiedliche TMDs und CTDs aufweisen. CIR1 besitzt die TMD und CTD des humanen IL-6 Rezeptors, welcher keine bekannten Internalisierungsmotive aufweist. CIR2 besteht aus der TMD des IL-6 Rezeptors und der CTD des Mannoserezeptors Endo180, der durch unterschiedliche endozytotische Motive charakterisiert ist. Er weist sowohl dihydrophobische als auch Tyrosin-basierte (FEGARY) Motive auf. In CIR3 findet sich TMD und CTD des FC γ RIIa Rezeptors, der zwar keine klassischen Internalisierungsmotive aufweist, dafür aber Tyrosin-aktivierte Motive (ITAMs) beinhaltet, welche für die phagozytotischen Eigenschaften des FC γ RIIa Rezeptors verantwortlich sind.^{143–146}

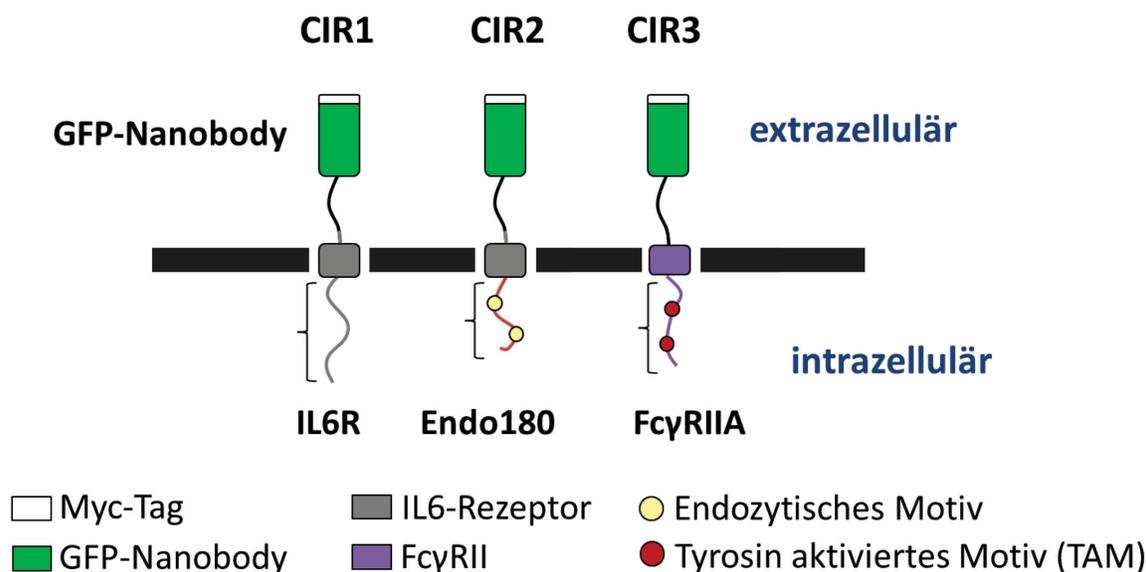


Abbildung 7.33: Aufbau der verschiedenen Cargo Internalization Rezeptoren.

Übersicht über den Aufbau der drei unterschiedlichen CIRs. Alle CIRs besitzen extrazellulär einen GFP-Nanobody sowie einen Myc-Tag. Über eine kurze Linkersequenz sind diese durch eine IL-6R (CIR1+2) bzw. FC γ RIIa (CIR3) Transmembranrezeptordomäne in der Membran verankert. Intrazellulär weisen alle drei unterschiedliche Domänen und somit Internalisierungsmotive auf. Der CIR1, mit einer humanen IL-6 Rezeptordomäne, besitzt keine klassischen Internalisierungsmotive. Der CIR2, mit der CTD des Mannoserezeptors Endo180, weist unterschiedliche endozytotische Motive, wie z. B. dihydrophobische oder auch Tyrosin-basierte (FEGARY) auf. Der CIR3, bestehend aus der FC γ RIIa-Rezeptordomäne, weist keine klassischen Internalisierungsmotive auf, dafür aber Tyrosin-aktivierte Motive (ITAMs)

Im Folgenden sollten diese CIRs genutzt werden, um Zellen, die einen der oben beschriebenen Rezeptoren exprimieren, mithilfe von GFP-gekoppelten PFCs ($^{GFP}PFCs$) spezifisch mittels ^{19}F -MRT zu visualisieren. Das dahinterstehende Konzept ist dabei, dass nach Bindung des GFPs an den GFP-Nanobody des Rezeptors (Abbildung 7.34 ①), die Internalisierung des Rezeptors eingeleitet wird (Abbildung 7.34 ②) und die $^{GFP}PFCs$ in die Zellen aufgenommen werden (Abbildung 7.34 ③). Anschließend kann das Perfluorkarbon mittels ^{19}F -MRT dargestellt werden. Da diese Rezeptoren vollkommen synthetisch sind und GFP normalerweise von keiner vorhandenen Oberflächenstruktur gebunden wird, ist dies ein hochspezifisches System, um Zellen mittels $^{GFP}PFCs$ anzusteuern und sichtbar zu machen. Zudem ist der Ansatz multimodal einsetzbar, da das GFP für Fluoreszenzmessungen und die PFCs für die ^{19}F -MRT genutzt werden können.

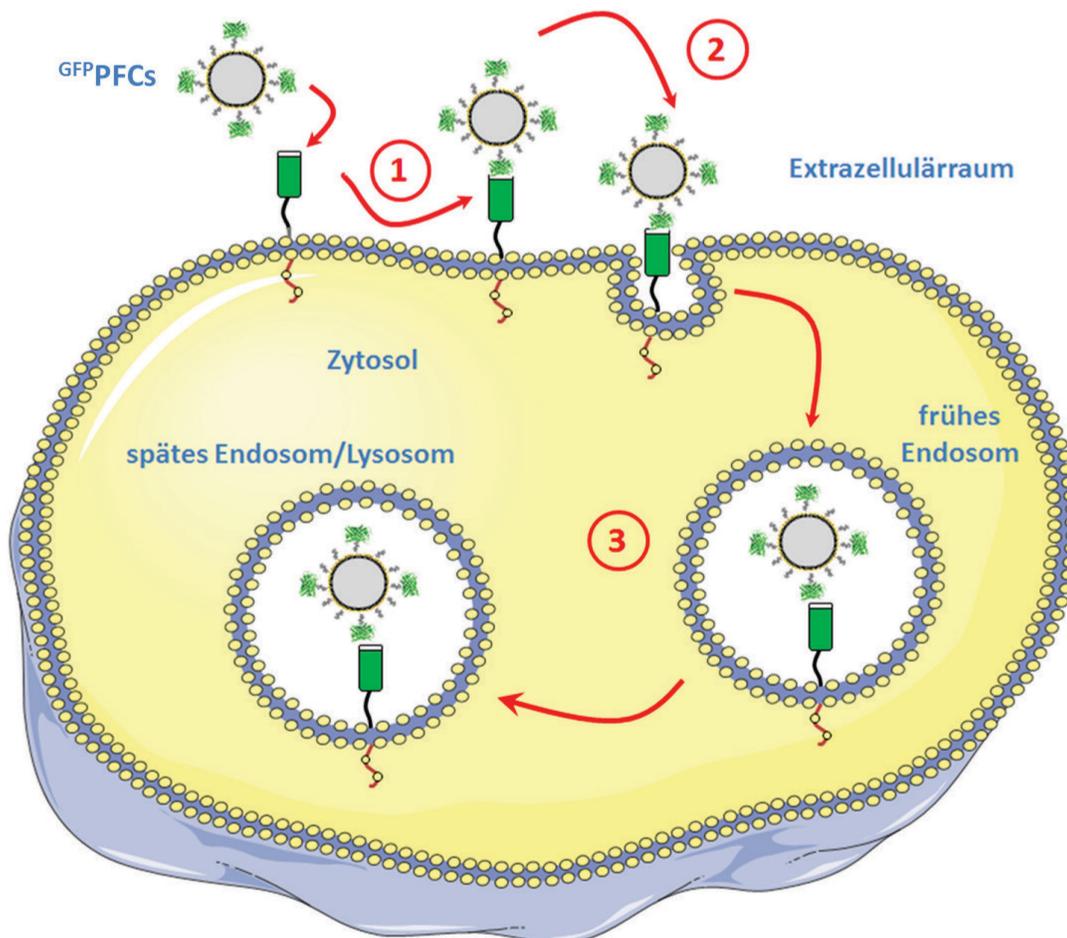


Abbildung 7.34: Schematische Übersicht der Funktion der CIRs.

Dargestellt ist die Funktionsweise der CIRs. ① Zellen mit dem Rezeptor werden mit $^{GFP}PFCs$ inkubiert, woraufhin das GFP an den GFP-Nanobody des Rezeptors bindet. ② Dies sorgt für die Internalisierung des Rezeptors - und damit auch des GFPs samt Emulsion - in die Zelle. ③ Die Aufnahme erfolgt vermutlich zunächst in ein Endosom, welches im späteren Verlauf mit einem Lysosom zu einem Endolysosom verschmilzt. (Bilder modifiziert nach Servier Medical Art)

7.2.2.1 Expression der CIRs

Um zunächst zu überprüfen, ob die CIRs auf Zellen exprimiert werden und sie auf der Zelloberfläche GFP binden, wurden CHO-Zellen zunächst transient mit der cDNA für CIR1-3 mittels Lipofektion transfiziert (siehe 6.2.3.1 Transiente Transfektion von CHO-Zellen), 48 Stunden danach mit GFP inkubiert und anschließend die Bindung des GFP durchflusszytometrisch analysiert. Dabei ergab sich eine Transfektionsrate von maximal 20 % (Abbildung 7.35). Im nächsten Schritt wurde eine GFP-Aufnahmekinetik über 80 Minuten durchgeführt (siehe 6.2.5.1 Aufnahmekinetik von GFP in CIR1-3). Dazu wurden die transient transfizierten Zellen abgelöst und in Suspension mit 1 µg/ml GFP inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen, gewaschen und die MFI der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Während CIR1 über die kompletten 80 Minuten eine sehr geringe GFP-Bindung zeigte, kann man beim CIR2 insbesondere in den ersten 20 Minuten einen deutlichen Anstieg des Signals messen, ab dann steigt die MFI bis zum 80-Minuten-Wert nur noch langsam an. CIR3 zeigt insgesamt die stärkste Bindung. Dabei ist bereits initial ein sehr starkes Signal zu erkennen, wonach auch hier das Signal nur noch langsam zunimmt (Abbildung 7.35 B).

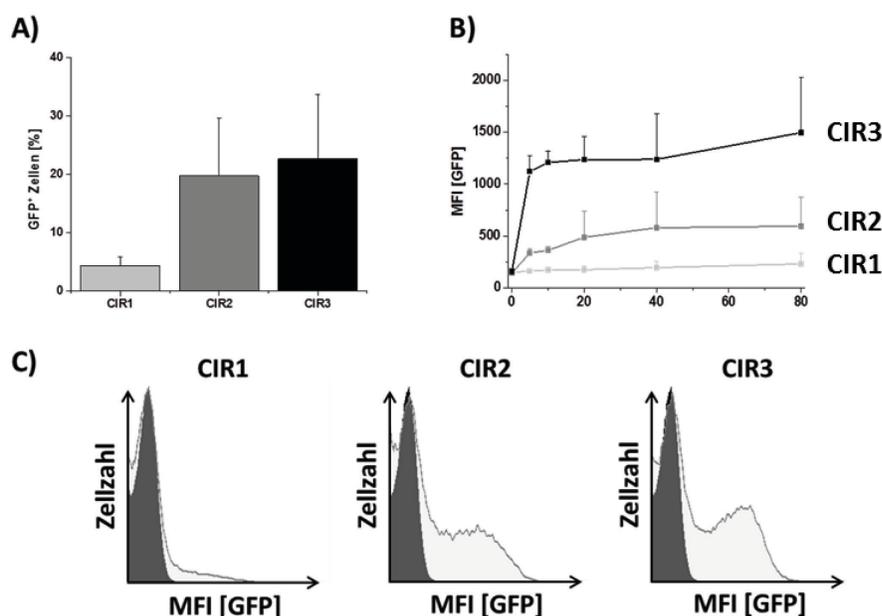


Abbildung 7.35: Bindung von GFP an transient transfizierte CHO-Zellen.

A) Prozentualer Anteil der mittels Lipofektion mit der cDNA von CIR1-3 transfizierten CHO-Zellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimieren. Die Zellen wurden 30 Minuten bei 4 °C mit 1 µg/ml GFP inkubiert und anschließend der Anteil an GFP⁺-Zellen bestimmt. Die Transfektionsraten sind insgesamt sehr gering und die des CIR1 liegt nochmals deutlich unter der des CIR2 und des CIR3. $n=4-5 \pm SD$ für alle Messpunkte. **B)** Aufnahmekinetik von GFP in transient transfizierten CIR-Zellen. Wie zu erkennen, nimmt das Signal innerhalb der ersten 5 Minuten zu und verbleibt danach fast auf demselben Niveau. Dabei konnte von CIR1 über CIR2 nach CIR3 jeweils ein Zuwachs an Signal festgestellt werden. $n=3-5 \pm SD$ für alle Messpunkte. **C)** Exemplarische Histogramme der transient transfizierten Zellen: Dunkelgrau = untransfizierte Zellen, hellgrau = transfizierte Zellen, die beide mit 1 µg/ml GFP für 80 Minuten bei 4 °C inkubiert wurden.

Da die Transfektionsraten der verschiedenen CIRs recht gering und sehr variabel waren, wurden daraufhin stabil transfizierte CHO-Linien für jeden CIR hergestellt (siehe 6.2.3.2 Herstellung von stabilen CIR1-3 transfizierten CHO-Zellen). Die Herstellung der stabilen CHO-Linien erfolgte mittels Lipofektion, Antibiotikaselektion mit Genistein und anschließendem Picken der Zellen. Nach deren Anwachsen wurde die Expression der CIRs mittels Durchflusszytometrie und Western Blot überprüft. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen abgelöst, für 30 Minuten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP bei 37 °C inkubiert und danach der Anteil an GFP⁺-Zellen bestimmt. Wie in den Histogrammen aus Abbildung 7.36 A erkennbar ist, exprimierten nun nahezu alle Zellen der jeweiligen Klone den entsprechenden Rezeptor (graue Histogramme), wohingegen nicht-transfizierte Kontrollzellen erwartungsgemäß keine Bindung des GFP zeigten (schwarze Histogramme).

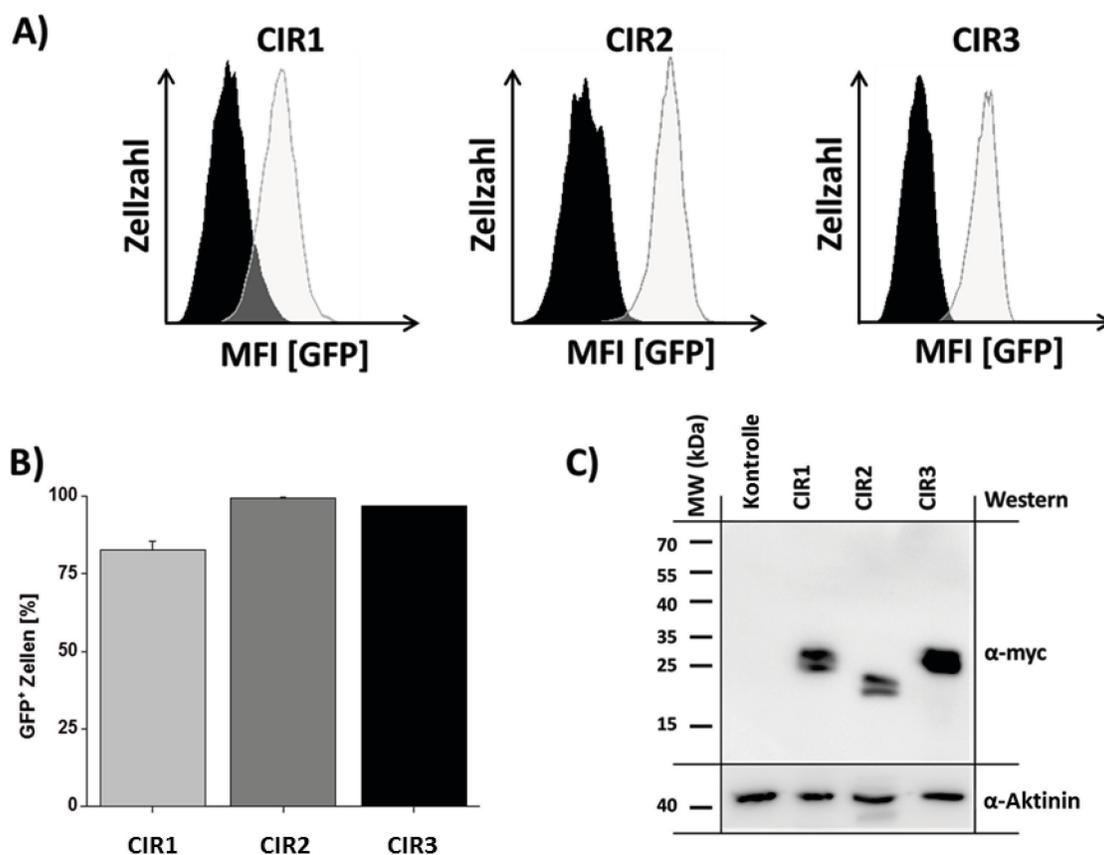


Abbildung 7.36: Nachweis der stabilen Transfektion von CIR1-3 in CHO-Zellen.

A) Exemplarische Histogramme der stabil CIR-transfizierten CHO-CIR1-3-Zellen (grau) und untransfizierten Kontrollzellen (schwarz). Die Zellen wurden 30 Minuten bei 4 °C mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP in MACS-Puffer inkubiert und anschließend der Anteil an GFP⁺-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. **B)** Anteil GFP-positiver Zellen nach stabiler Transfektion der CHO Zellen (CIR1: 82,7 ± 2,8 %; CIR2: 99,5 ± 0,05 %; CIR3: 96,8 ± 0,2 %). **C)** Zum Vergleich des Gesamt-CIR-Gehaltes wurde, in Kooperation mit der Biochemie und Molekularbiologie II von Paul Baran, ein Western Blot gegen den Myc-Tag der CIRs durchgeführt. Es zeigte sich eine vergleichbare Gesamtproteinmenge an CIR1 und CIR2, wohingegen CIR3 stärker exprimiert wird.

In den Histogrammen fällt auf, dass der ‚Shift‘ des GFP-Signals für die jeweiligen CIRs verschieden stark ausgeprägt ist, was auf eine unterschiedliche Oberflächenexpression der einzelnen CIRs hindeutet. Daher wurde zusätzlich auf Proteinebene untersucht, ob dies auf eine divergierende Expressionen der CIRs in den stabil transfizierten CHO-Zellen zurückzuführen ist. Dies wurde in Kooperation mit Paul Baran aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass CIR1 und CIR2 vergleichbare Expressionniveaus aufwiesen, während CIR3 deutlich stärker exprimiert wurde (Abb. 7.36 C). Die unterschiedlichen Oberflächenexpressionprofile sind demnach offenbar zum Teil auch noch durch differentiellen Transport des Rezeptors auf die Zelloberfläche bedingt.

7.2.2.2 Herstellung und Charakterisierung von ^{GFP}PFCs

Da die Funktionalität der CIRs sowohl in transienten als auch stabilen Linien demonstriert werden konnte, wurde im nächsten Schritt das GFP in PFCs mittels SPIT integriert, um eine Detektion der CIR⁺-Zellen mittels ¹⁹F-MRT zu ermöglichen. Bei der SPIT handelt es sich, wie im vorherigen Kapitel bereits dargelegt, um eine Sterol-basierte post Insertionstechnik,¹²³ die hier auch für das Einbringen des GFP in die Emulsionen genutzt wurde. Dazu wurde das GFP an einen Cholesterol-PEG-NHS-Anker über primäre Aminogruppen gekoppelt. Das N-Hydroxysuccinimid (NHS) reagiert dabei unter Abspaltung von H₂O mit primären Aminogruppen und führt so zu einer stabilen Bindung des GFP an an die PEG-Einheit. Anschließend wurde das gesamte Konstrukt zu der vorgefertigten Emulsion hinzugefügt, woraufhin die Cholesterolgruppe spontan in die Lipidmembran der Emulsion integriert (über Nacht bei 20 °C) und so ein stabiler Einbau des GFPs in die Emulsion erfolgt (siehe 6.1.2.2). Nach Herstellung der Emulsion wurde die Größe, Größenverteilung sowie das ζ-Potenzial im Vergleich zu ungekoppelten Emulsionen mittels Photonen-Korrelationsspektroskopie ermittelt, wie auch die MFI bestimmt (Abbildung 7.37 obere Reihe). Wie zu erkennen, sind die ^{GFP}PFCs (grüne Balken), verglichen mit ungekoppelten Emulsionen (graue Balken) etwas größer, der PDI ist etwas höher und das ζ-Potenzial ist leicht positiver. Erwartungsgemäß lassen sich deutliche Unterschiede in der Fluoreszenz beobachten, da nun das GFP in die Emulsion integriert wurde.

Der Cholesterolanker gewährleistet allerdings nur eine relativ lockere Bindung des GFPs an die Lipidschicht der Emulsionen. Daher besteht die Gefahr, dass bei Internalisierung der ^{GFP}PFCs durch die CIRs das GFP aus der Lipidhülle herausgezogen wird und die PFC-Fracht an der Zelloberfläche abgestreift wird. Daher wurde alternativ noch eine Kopplung über eine kovalent an die Lipidmembran gebundene Maleimidgruppe vorgenommen. Dafür wurde das GFP zunächst mittels Traut's Reagenz thioliert, um so eine freie Sulfhydrylgruppe an das GFP einzubringen. Die Kopplung an die Emulsion

erfolgte dann durch Michael-Reaktion des Maleimid mit der eingeführten Sulfhydrylgruppe. Diese Emulsionen wurden zusätzlich mit einem Rhodamin-gekoppeltem Lipid ausgestattet, um nach einem möglichen Abscheren des GFPs das Schicksal der PFCs über diese zweite Fluoreszenzmarkierung verfolgen zu können. Nach Kopplung des GFP ergab sich auch hier eine leichte Größenzunahme der Partikel bei geringfügiger Änderung des PDI (Abbildung 7.37). Interessanterweise war diesmal das Einführen des GFPs von einem deutlich negativeren ζ -Potenzial begleitet. Zudem führte die Kopplung und Aufreinigung der Emulsionen zu einem deutlichen Verlust an Rhodaminfluoreszenz (im Diagramm Emulsion).

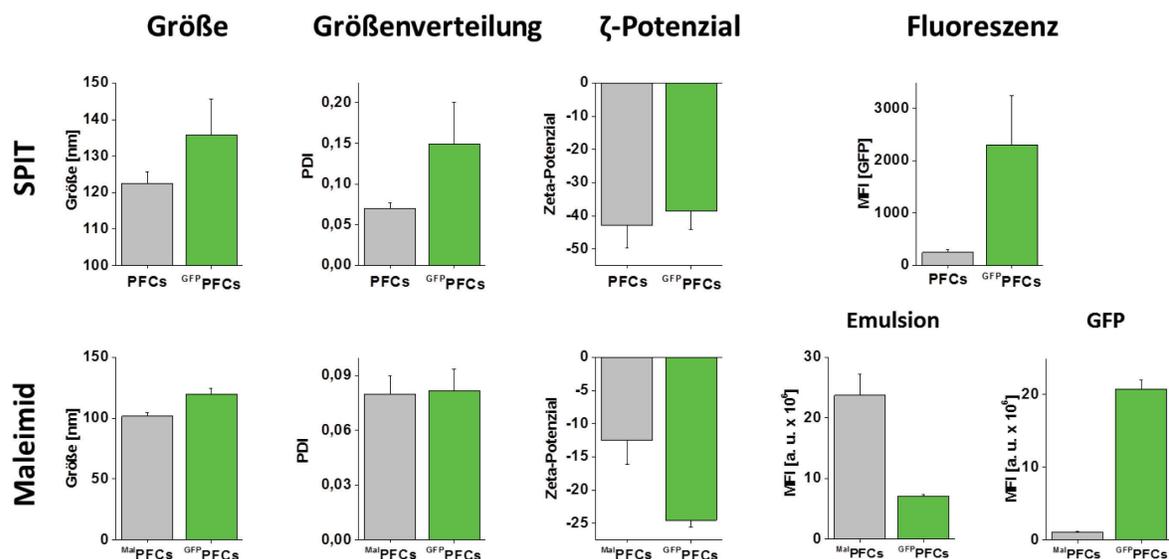


Abbildung 7.37: Charakterisierung der GFP^{PFCs} .

Obere Reihe: Charakterisierung der GFP^{PFCs} mittels PCS und Fluoreszenzmessungen im Vergleich zu PFCs vor der GFP-Kopplung. Dabei lässt sich ein Zuwachs in der Größe (PFCs: $122,6 \pm 3,1$ nm; GFP^{PFCs} : $135,8 \pm 9,9$ nm), aber auch in der Größenverteilung (PFCs: $0,07 \pm 0,007$; GFP^{PFCs} : $0,15 \pm 0,05$) ausmachen, wohingegen das ζ -Potenzial (PFCs: $-42,9 \pm 6,8$ mV; GFP^{PFCs} : $-38,6 \pm 5,7$ mV) nur geringfügig abnimmt. Außerdem lässt sich klar die eingeführte GFP-Fluoreszenz detektieren; $n = 3 \pm SD$ für alle PCS- und Fluoreszenzmessungen. **Untere Reihe:** Charakterisierung der GFP^{PFCs} , welche mittels Kopplung an Mal^{PFCs} hergestellt wurden. Die erfolgreiche Kopplung wurde anhand von Fluoreszenzmessungen bestätigt. Nach der Kopplung und Reinigung ist eine Abnahme in der Rhodaminfluoreszenz (Mal^{PFCs} : $23,7 \pm 3,4$; GFP^{PFCs} : $7,07 \pm 0,25$) und eine Zunahme in der GFP-Fluoreszenz (Mal^{PFCs} : $1,05 \pm 0,14$; GFP^{PFCs} : $20,8 \pm 1,16$) zu beobachten. Zudem wurde die Größe (Mal^{PFCs} : $101,6 \pm 3,2$ nm; GFP^{PFCs} : $119,8 \pm 4,8$ nm), die Größenverteilung (Mal^{PFCs} : $0,082 \pm 0,012$; GFP^{PFCs} : $0,08 \pm 0,01$), sowie das ζ -Potenzial (Mal^{PFCs} : $-12,49 \pm 3,7$ mV; GFP^{PFCs} : $-24,5 \pm 1,11$ mV) bestimmt; $n = 3 \pm SD$ für alle Messpunkte.

Um auszuschließen, dass bei der Herstellung ein unerwünscht hoher Anteil leerer Liposomen entstanden ist, führte unser Kooperationspartner Wolfgang Krämer aus Freiburg (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie) noch zusätzlich Kryo-TEM-Aufnahmen der GFP^{PFCs} vor und nach

Kopplung durch. Wie in Abbildung 7.38 gezeigt, konnte jedoch sowohl vor und auch nach der Kopplung nur ein sehr geringer Anteil an Liposomen ausgemacht werden (rote Pfeile).

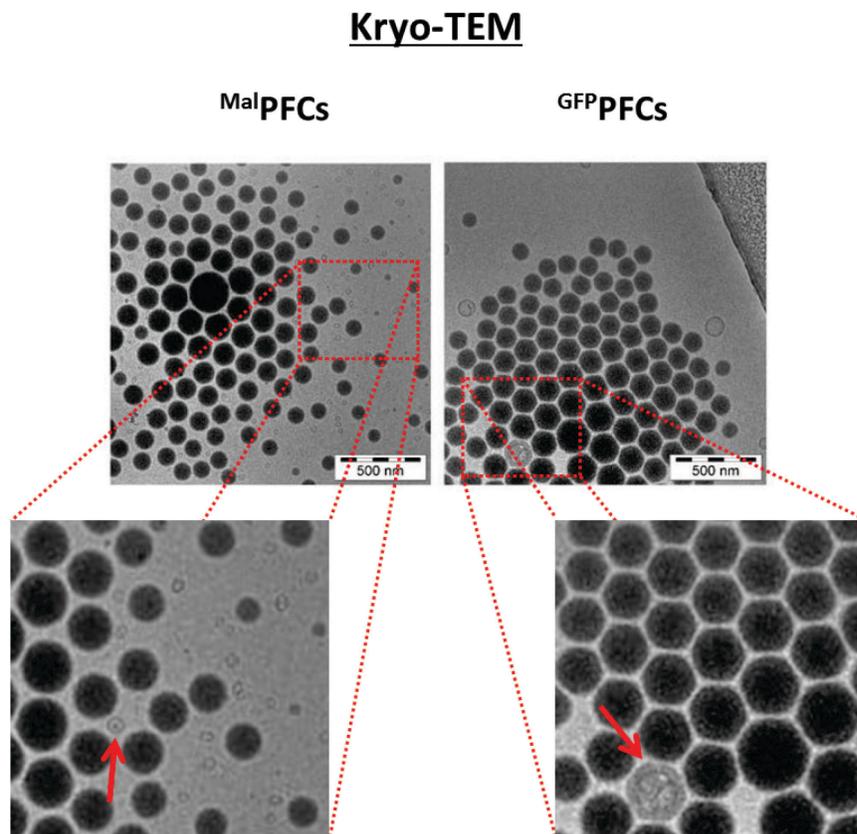


Abbildung 7.38: Kryo-TEM Aufnahmen der ^{GFP}PFCs.

Gezeigt sind Kryo-TEM-Aufnahmen der Emulsionen vor und nach Kopplung des GFP an ^{Mal}PFCs. Liposomen lassen sich in der Präparation anhand der grünlischen Färbung erkennen, wohingegen die Emulsionen dunkel gefärbt sind. In beiden Präparationen konnte nur ein geringer Anteil an Liposomen festgestellt werden. Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit der pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie in Freiburg von Wolfgang Krämer hergestellt.

7.2.2.3 Bindung und Internalisierung von ^{GFP}PFCs

Nach Herstellung und Charakterisierung der ^{GFP}PFCs wurde die Aufnahme durch die unterschiedlichen CIRs untersucht, um zu klären, welcher CIR sich am besten für ein aktives Targeting von Zellen eignet.

7.2.2.3.1 ^{19}F -MRT-Messungen

Da das primäre Ziel die Entwicklung eines Zelltyp-spezifischen Targeting-System für die ^{19}F -MRT war, sollte als erstes die Aufnahme der $^{\text{GFP}}$ PFCs in CIR^+ -Zellen durch diese Technik überprüft werden. Dazu wurden im Folgenden transient transfizierte CIR1-3-Zellen sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle mit den $^{\text{GFP}}$ PFCs bei 4 °C 4 Stunden vorinkubiert und anschließend freie $^{\text{GFP}}$ PFCs durch Waschen entfernt. Zur Internalisierung der gebundenen Partikel wurden die Zellen daraufhin für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, in ein PCR-Röhrchen überführt und das ^{19}F -Signal der Zellen gemessen. Dabei zeigte sich ausgehend von der Kontrolle zu CIR1, CIR2 und CIR3 ein zunehmend stärkeres ^{19}F -Signal (Abbildung 7.39 A). Zusätzlich wurden Fluoreszenzmessungen von den Zellpellets mittels IVIS durchgeführt. Auch dabei konnte ein, von der Kontrolle ausgehendes, von CIR1-3 zunehmend stärker werdendes Signal beobachtet werden (Abbildung 7.39 B). In beiden Fällen (Fluor- und Fluoreszenzmessungen) erreichten die Unterschiede für CIR2 und CIR3 das Signifikanzniveau, wobei diese interessanterweise bei den ^{19}F -MRT-Messungen deutlich stärker ausgeprägt waren.

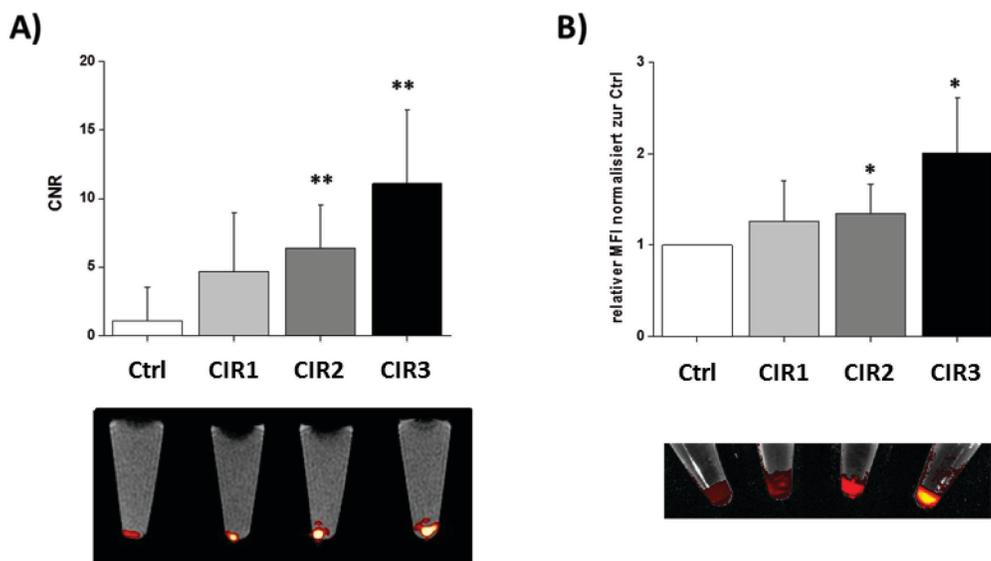


Abbildung 7.39: Darstellung der transient transfizierten Zellen mittels ^{19}F -MRT und IVIS.

A) ^{19}F -MRT-Messungen der Zellpellets wurden jeweils auf eine Kontrolle normiert, welche mit PFCs ohne GFP inkubiert wurden. Deutlich lässt sich die Zunahme des Signals vom CIR1 bis zum CIR3 ausmachen. CIR2 und CIR3 zeigen signifikant mehr Signal gegenüber der Kontrolle (Ctrl: $1,07 \pm 2,46$; CIR1: $4,66 \pm 4,28$; CIR2: $6,4 \pm 3,1$; CIR3: $11,1 \pm 5,37$); $n=7-8 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte. ** = $p < 0,01$. **B)** Fluoreszenzmessung der Zellpellets im IVIS. Alle Messungen wurden auf die Kontrolle (Zellen ohne Rezeptor) normiert. Das Fluoreszenzsignal steigt von CIR1 bis CIR3 immer weiter an, wobei die CIR2 und CIR3, wie auch bei den ^{19}F -Messungen, signifikant mehr Signal aufweisen als die Kontrolle (CIR1: $1,26 \pm 0,45$; CIR2: $1,34 \pm 0,32$; CIR3: $2 \pm 0,61$); $n=7-8 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte. * = $p < 0,05$.

In weiteren Experimenten wurde zudem die Aufnahme von ^{19}F -PFCs in stabil exprimierenden CIR1-3-Zellen mittels ^{19}F -MRT untersucht. CIR⁺-Zellen sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle wurden mit ^{19}F -PFCs über Nacht inkubiert, anschließend intensiv gewaschen und abgelöst (siehe 6.2.5.4 Aufnahme von ^{19}F -PFCs mittels ^{19}F -Messungen). Danach wurden die Zellen auf einem Dichtegradienten aufgetragen und direkt ins MRT überführt. In Abbildung 7.40 sind links Fotos der Zentrifugenröhrchen dargestellt, in denen sich die Zellschicht als weiße Phase (gelber Pfeil) zwischen Percoll und PBS erkennen lässt. In den T2-gewichteten ^1H -MRT-Bildern stellt sich die Percoll-Phase dunkel dar, während die wässrige Phase hell erscheint. Die Zellschicht grenzt sich davon deutlich als dunkelgraue Linie ab. Im korrespondierenden ^{19}F -MRT-Bild lässt sich klar das Fluorsignal in den Zellen ausmachen (Abbildung 7.40 A). Während in den CHO-Zellen ohne Rezeptor nur ein geringes Hintergrundsignal messbar war, sind unter CIR-Expression deutliche ^{19}F -Signale detektierbar. Die Quantifizierung des Gesamtfluorgehalts in den Zellen ergab ausgehend von der Kontrolle über CIR1, CIR3 und CIR2 eine zunehmend stärkere PFC-Aufnahme. Ähnlich wie bei den transient transfizierten Zellen sind nur die Werte für CIR1 nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 7.40 B).

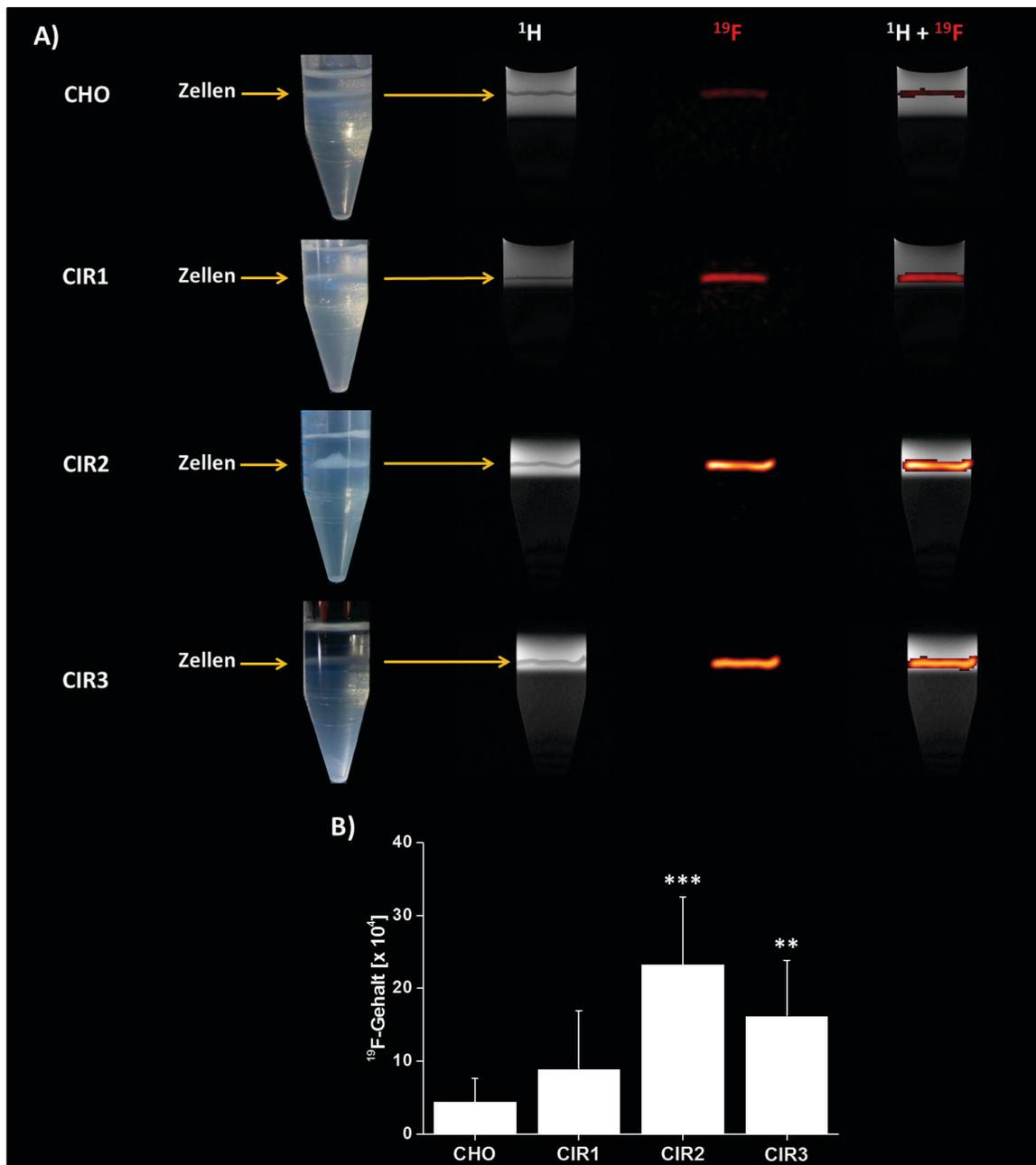


Abbildung 7.40: Visualisierung von CIR-exprimierenden CHO-Zellen mittels ^{19}F -Bildgebung:

A) CHO- und CHO-CIR1-3-Zellen wurden mit GFP^{PFCs} inkubiert und über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt. Links sind die Fotos der 15-ml-Falcons zu sehen, in denen die Zellschicht als weiße Schicht zwischen der Percoll- und der PBS-Phase liegt. Durch RARE-Sequenzen lässt sich das Zellpellet im ^1H -Scan sehr gut im MRT visualisieren. Dabei grenzt es sich als schwarze Linie zwischen den Phasen ab. Durch ortskorrespondierende Fluorscans kann man daraufhin das Fluorsignal in den Zellen bestimmen. Durch Überlagerung des ^1H - und ^{19}F -Bildes lässt sich der Fluorgehalt den jeweiligen Zellen zuordnen. **B)** Auswertung des Gesamtfluorgehaltes in den verschiedenen Zellen. Der Gesamtfluorgehalt steigt ausgehend von der Kontrolle über CIR1 und CIR3 bis CIR2 immer weiter an. CIR2 und CIR3 zeigen signifikant mehr Fluorgehalt im Vergleich zur Kontrolle; $n=6 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

7.2.2.3.2 Durchflusszytometrische Messungen

Nach der durch ^{19}F -MRT gezeigten Inkorporation der $^{\text{GFP}}$ PFCs in CIR^+ -Zellen, wurde als nächstes deren Aufnahmekinetik mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde sowohl das Fluoreszenzsignal des GFP als auch das der Emulsion (Rhodamin) gemessen. Hierfür wurden stabil transfizierte Zellen mit $^{\text{GFP}}$ PFCs bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und zu definierten Zeitpunkten die Fluoreszenz bestimmt. Wie in Abbildung 7.41 zu erkennen ist, zeigte CIR1 in den ersten 5 Minuten ein starkes MFI-Signal, welches dann über die Zeit nicht mehr allzu sehr zunahm. Dabei ist der Zeitverlauf für GFP und Rhodamin stets sehr vergleichbar. Auch bei CIR2 war initial ein hoher Wert beobachtbar, woraufhin das Signal zwar langsamer, aber stetig, über die 80 Minuten anstieg. Auch hier sind die Signale des GFP und der Emulsion fast deckungsgleich. CIR3 zeigte ein ähnliches Verhalten wie CIR1, allerdings waren die gemessenen Werte deutlich höher. Bereits initial konnte ein starker Anstieg detektiert werden, welcher dann über die Zeit stagnierte. In Schwarz sind jeweils die mit $^{\text{GFP}}$ PFCs inkubierten nicht-transfizierten CHO-Zellen als Kontrolle dargestellt. Dabei konnte weder beim GFP, noch beim Rhodamin ein Signal festgestellt werden.

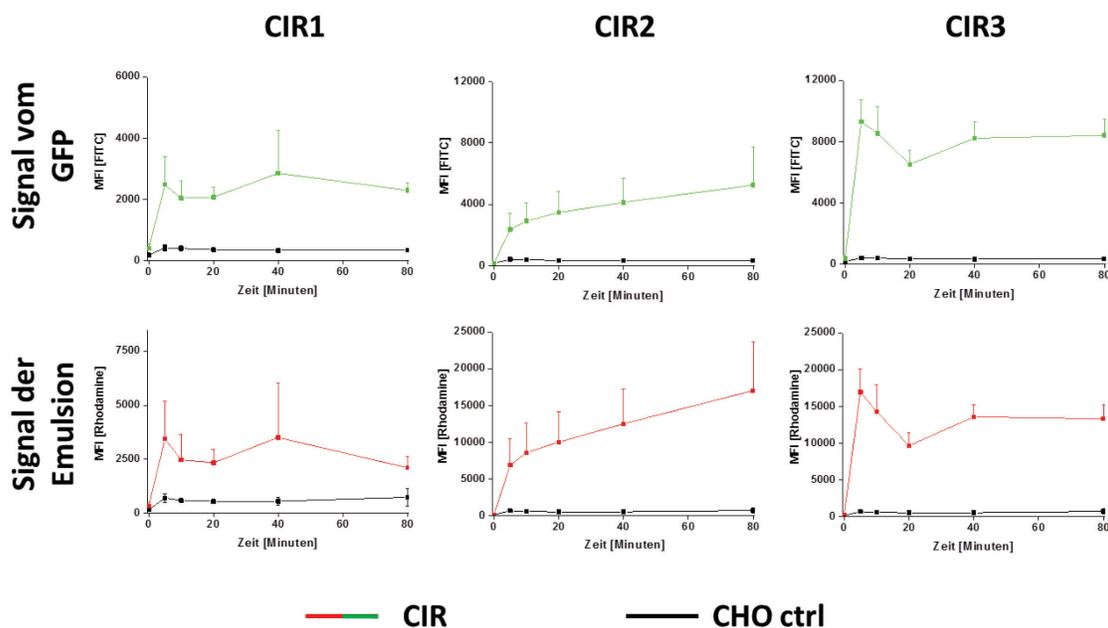


Abbildung 7.41: Aufnahmekinetik von $^{\text{GFP}}$ PFCs in stabile CHO-CIR1–3-Zellen.

Aufnahmekinetik der $^{\text{GFP}}$ PFCs von stabil exprimierenden CIR^+ -Zellen. Gemessen wurde sowohl das Signal des GFPs (obere Reihe), als auch das Rhodamin der Emulsion (untere Reihe). Die Verläufe der GFP- und Rhodamin-Messung sind dabei stets vergleichbar und unterscheiden sich nur in der Stärke des Signals. $n=3-5 \pm \text{SD}$ für alle Messpunkte.

7.2.2.3.3 Immunzytochemie

Die bislang erhobenen Daten zeigen eine klare Akkumulation von GFP^{PFCs} in CIR^+ -Zellen. Um auch tatsächlich die Internalisierung der Partikel unter CIR-Expression nachzuweisen und eine nur oberflächliche Bindung auszuschließen, wurden zusammen mit Dr. Sebastian Temme aus unserem Institut immunzytochemische Färbungen angefertigt. Dazu wurden die mit den unterschiedlichen Rezeptoren transient transfizierten Zellen mit GFP sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C inkubiert. Wie in Abbildung 7.42 zu erkennen, ließ sich bei 4 °C eine homogene Bindung des GFP an die Oberfläche der Zellen beobachten. Hingegen zeigten sich bei 37 °C einzelne punktuelle Anfärbungen innerhalb der Zelle, welche klar für eine Internalisierung des GFP sprechen (Abbildung 7.42). Dies konnte in dieser Form bei allen drei unterschiedlichen Rezeptoren nachgewiesen werden.

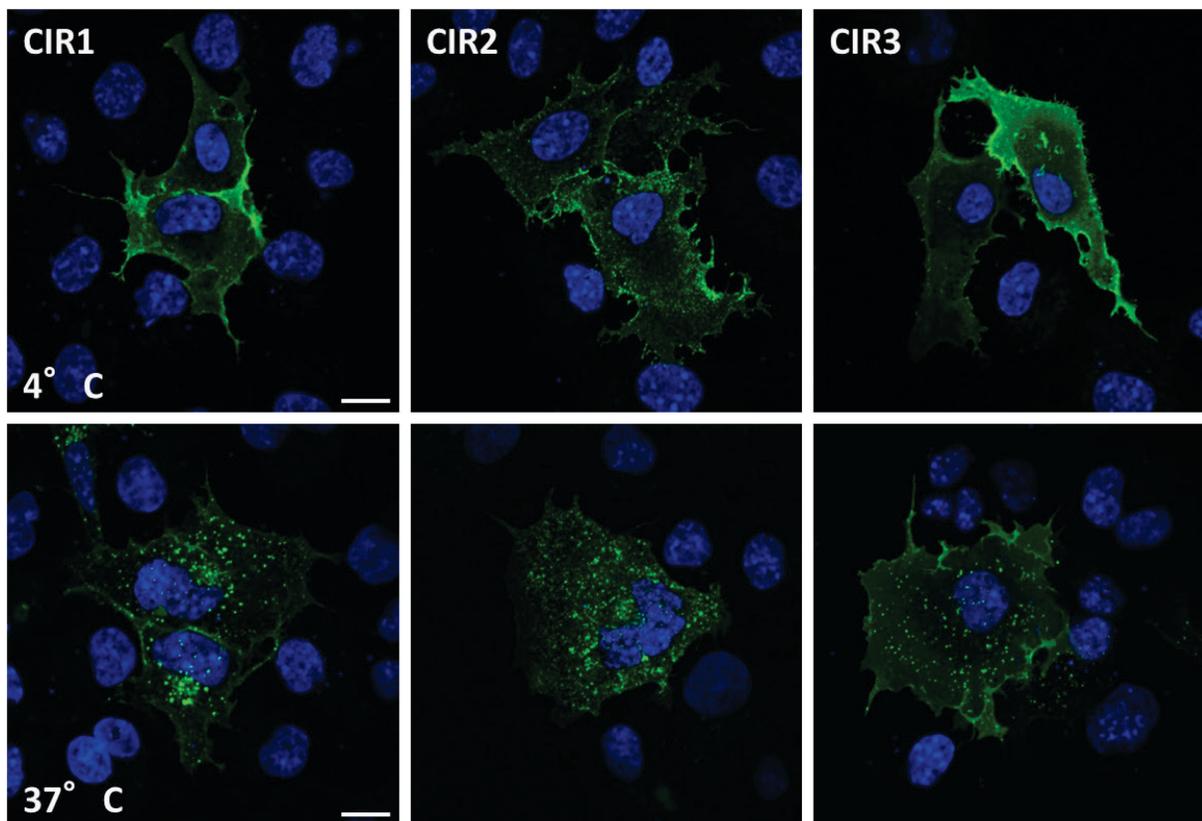


Abbildung 7.42: Immunzytochemische Färbungen der transient transfizierten COS-7 Zellen.

Transient transfizierte COS-7-Zellen, welche mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GFP bei 4 bzw. 37 °C inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mittels DAPI markiert (blau). Bei 4 °C Inkubation lässt sich eine kontinuierliche Färbung der kompletten Zelloberfläche erkennen. Hingegen erfolgt bei 37 °C eine schwächere Färbung der Zelloberfläche und stattdessen punktuelle Anfärbungen, die auf eine Internalisierung des GFPs hindeuten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

In weiteren Experimenten wurde die Integrität der ^{GFP}PFCs Emulsion nach Internalisierung überprüft. Hierbei wurde zusätzlich die Zelloberfläche mittels WGA (*wheat germ agglutinin*) gefärbt und die Rhodaminfluoreszenz der Emulsion mit in die Analyse einbezogen. Abbildung 7.43 zeigt eindeutig für alle drei CIRs im Rhodaminkanal punktuelle Anfärbungen im Bereich des Zytoplasmas und die häufige Kolo-kalisation dieses Signals mit GFP spricht klar für die Integrität der Emulsion nach der Internalisierung.

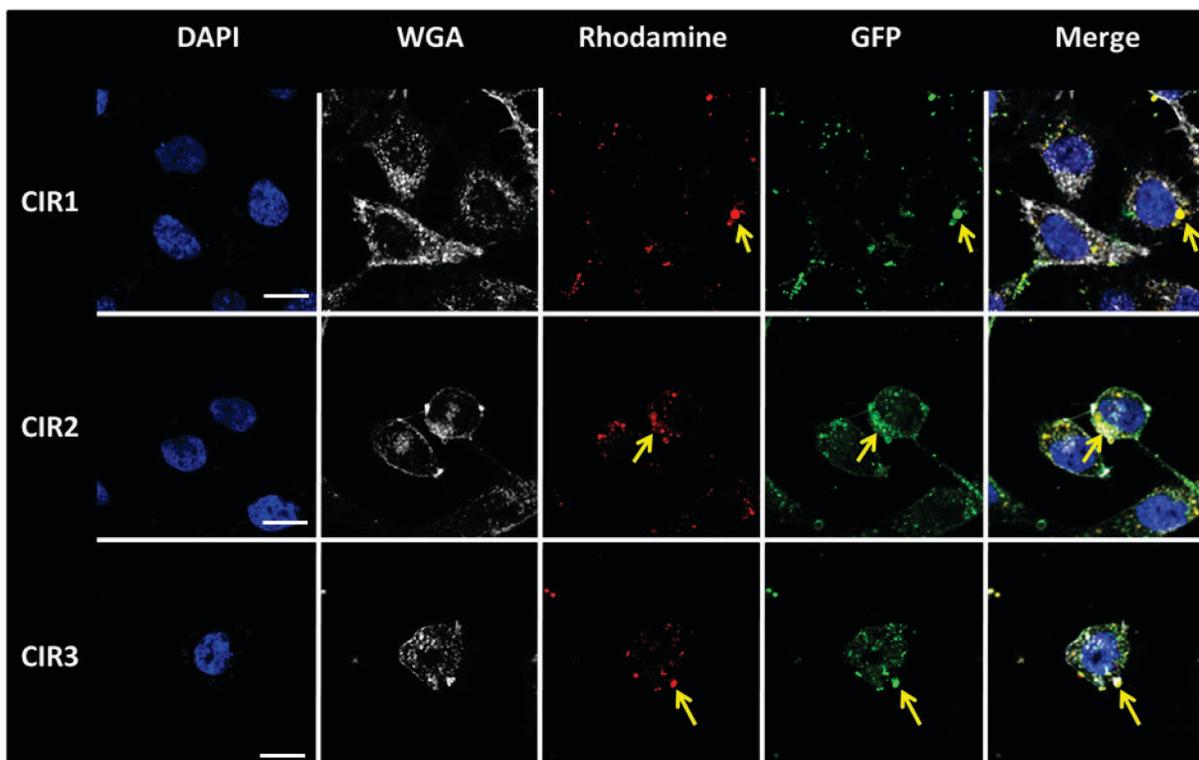


Abbildung 7.43: Immunzytochemische Färbungen der stabil transfizierten CHO-CIR1 – 3 Zellen.

Immunzytochemische Färbungen der stabilen CIR⁺-Linien. Die Zellkerne sind mit DAPI, die Zellmembran mit WGA angefärbt. Bei allen Ansätzen lassen sich deutlich die Färbungen durch Emulsion (Rhodamin) und GFP erkennen. Diese sind häufig (gelbe Pfeile) und befinden sich im Zytoplasma der Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

7.2.2.4 Konkurrenzexperimente

Um die Spezifität der ^{GFP}PFCs für die CIRs detaillierter zu untersuchen, wurden zusätzlich Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Rezeptoren zunächst mit einem Überschuss an GFP (5 $\mu\text{g/ml}$) bei 4 $^{\circ}\text{C}$ abgesättigt, woraufhin im zweiten Schritt die Zellen, wie zuvor mit den ^{GFP}PFCs, bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben abgenommen und die Aufnahme der ^{GFP}PFCs durchflusszytometrisch im Rhodaminkanal untersucht (Abbildung 7.44).

Ohne Präinkubation ließ sich dabei für alle CIRs ein ganz ähnlicher Verlauf der Fluoreszenzsignale beobachten wie zuvor schon in Abbildung 7.42. Demgegenüber zeigte sich bei Vorinkubation mit freiem GFP eine massive Abnahme der Rhodaminsignale insbesondere für die beiden ‚aufnahmeaktiven‘ CIR2+3 (Abbildung 7.44). Offenbar führt die Präinkubation zu einer nahezu völligen Blockade der CIR-Bindungsstellen, so dass keine ^{GFP}PFCs mehr andocken und auch nicht internalisiert werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass zumindest über den gewählten Beobachtungszeitraum kein relevantes Rezeptorre cycling erfolgt.

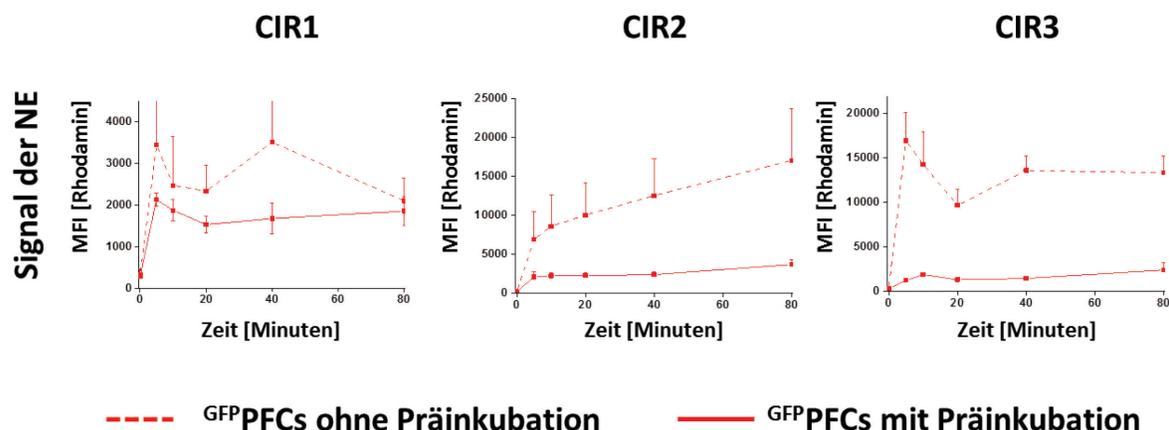


Abbildung 7.44: Präinkubation der CHO-CIR1-3-Zellen mit GFP.

Um die Spezifität der ^{GFP}PFCs für die Rezeptoren detaillierter zu untersuchen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst bei 4 °C mit 5 µg/ml GFP vorinkubiert, um Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurden diese mit den ^{GFP}PFCs inkubiert. Deutlich zu erkennen ist die Reduktion des Rhodaminsignals, insbesondere bei CIR2 und CIR3; n=3 ± SD für alle Messpunkte (unterschiedliche Skalierungen für CIR1-3).

7.2.2.5 Aufnahme von ^{GFP}PFCs in einer Ko-Kultur von CIR⁺-Zellen und murinen Immunzellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob CIR⁺-Zellen erfolgreich mit auf Phagozytose spezialisierten Zelltypen um die Aufnahme der ^{GFP}PFCs konkurrieren können, was eine entscheidende Voraussetzung für eine Übertragung des CIR-Ansatzes von *in vitro* auf *in vivo* Bedingungen in zelltypspezifischen CIR⁺-Mäusen ist. Herfür wurden stabil transfizierte CIR⁺-Zellen mit Mausimmunzellen ko-kultiviert, mit ^{GFP}PFCs inkubiert und anschließend das Rhodaminsignal in den einzelnen Zellfraktionen (CIR⁺, Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 6.2.5.5 Ko-Kultur zur Ermittlung der Spezifität der).

Murine Immunzellen und CHO-CIR⁺-Zellen ließen sich durch Färbung mit CD45 und anhand des FSC/SSC-Musters einfach unterscheiden (Abbildung 7.45): CHO-Zellen exprimieren kein CD45 und

sind zudem im FSC/SSC deutlich größer (lila Zellpopulation). Aus Abbildung 7.45 lässt sich erkennen, dass die lymphoiden Zellen erwartungsgemäß so gut wie keine, die myeloiden Zellen hingegen deutliche Rhodaminsignale aufwiesen. Bemerkenswerterweise konnte aber in den CIR2⁺- und CIR3⁺-Zellen ein um ein vielfach stärkeres Signal ausgemacht werden als in den myeloiden Zellen der Maus. Die Ergebnisse aus diesen Konkurrenzexperimenten legen daher den Schluss nahe, dass CIR⁺-Zellen auch *in vivo* in Konkurrenz mit phagozytosekompetenten Zellen spezifisch mit GFP⁺PFCs angesteuert werden können.

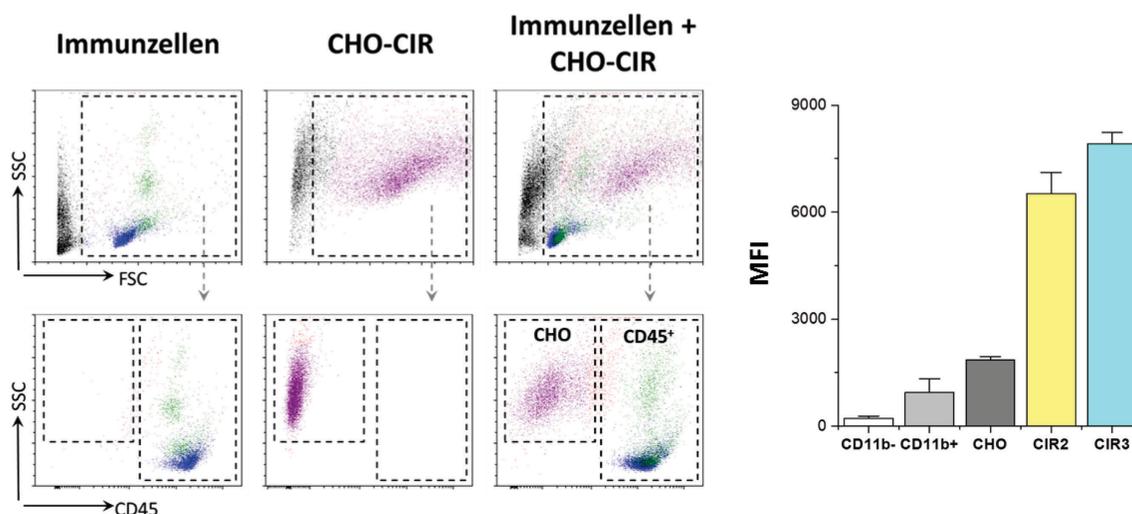


Abbildung 7.45: Ko-Kultur von CIR und murinen Immunzellen.

Gezeigt ist die Aufnahme von GFP⁺PFCs in Ko-Kultur von stabilen CIR⁺-CHO-Zellen und murinen Immunzellen. Die murinen Immunzellen und CHO/CIR Zellen lassen sich mittels FSC/SSC-Gating deutlich voneinander abgrenzen. Zudem wurden die Immunzellen mittels eines CD45-Antikörpers nachgewiesen. Bei der Auswertung des Fluoreszenzgehaltes wird die stärkere Aufnahme der GFP⁺PFCs durch die CIR2 und CIR3 deutlich. Selbst die Monozyten (CD11b⁺) weisen, verglichen mit den CIR⁺-Zellen, geringe Werte auf.

7.2.2.6 *In vivo* Detektion von CIR⁺-Zellen innerhalb eines Matrigel/LPS-Entzündungsmodells

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich CIR⁺-Zellen im Prinzip auch in Gegenwart phagozytischer Immunzellen mit GFP⁺PFCs markieren lassen, wurde das Gesamtkonzept final noch einer Überprüfung *in vivo* unterzogen. Dazu wurde erneut das bereits beschriebene Matrigel/LPS-Modell verwendet. Hierbei wurden dem Matrigel neben LPS zusätzlich 5×10^6 CIR2⁺- bzw. CIR3⁺-Zellen zugemischt und anschließend subkutan implantiert. Nach intravenöser Injektion der GFP⁺PFCs wurde das Fluorsignal im Bereich des Matrigels gemessen. In Abbildung 7.46 ist beispielhaft eine der Matrigelmessungen gezeigt. Mittels ¹H-MRT ließ sich wie zuvor das Matrigel eindeutig im Nacken der Maus identifizieren und die ortskorrespondierenden ¹⁹F-MRT-Bilder zeigten ein klares Fluorsignal im Randbereich des Gels. Die LPS-induzierte Entzündung führt offenbar vor allem in der Randzone des Matrigels zu einer

Öffnung der endothelialen Barriere, so dass bevorzugt die dort befindlichen CIR⁺-Zellen die GFP⁺PFCs aus dem Blutstrom aufnehmen können. Die beobachteten ¹⁹F-Muster sind im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen in diesem Modell (siehe auch Abb. 7.14) und demonstrieren eindeutig die Aufnahme von GFP⁺PFCs durch CIR⁺-Zellen *in vivo*.

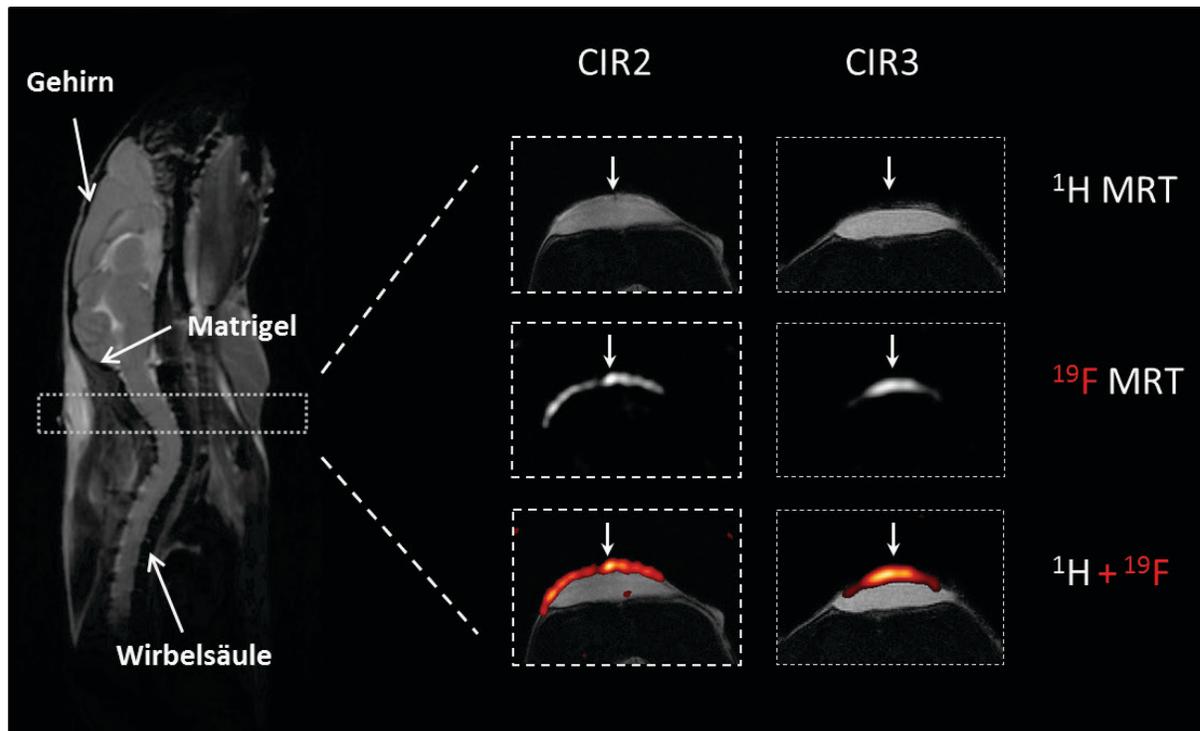


Abbildung 7.46: *In vivo* Detektion von CIR-exprimierenden BaF3-Zellen.

BaF3-CIR2⁺- und BaF3-CIR3⁺-Zellen (5×10^6) wurden in 50 μ l Matrigel eingebettet und s. c. in den Nacken der Maus appliziert. Nach i. v. Injektion von 100 μ l GFP⁺PFCs wurde das Matrigel mittels ¹H-MRT identifiziert und über 9 Schichten a 1 mm komplett dargestellt. Anschließend wurden ortskorrespondierende ¹⁹F-MRT-Bilder aufgenommen. Durch Überlagerung beider Scans lässt sich so das Fluorsignal in und um das Matrigel ausmachen.

8. Diskussion

In den letzten Jahren ist zunehmend klarer geworden, dass inflammatorische Prozesse bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. So konnten z. B. Morbus Alzheimer, Fettleibigkeit oder auch Schizophrenie mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht werden,^{147–150} aber auch in der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt prägen die infiltrierenden Immunzellen in entscheidender Weise den anschließenden Heilungsverlauf.^{41,151–153} Um über ein Tracking individueller Immunzellpopulationen Krankheitsverläufe detaillierter zu charakterisieren und mögliche neue Therapieansätze zu identifizieren, rücken daher moderne Verfahren zur molekularen Bildgebung immer mehr in den Vordergrund des Interesses. Im Zentrum vieler Untersuchungen steht dabei die Ansteuerung einzelner Zelltypen zur spezifischen Beladung mit Kontrastmitteln – ein solches aktives Targeting wäre über die Diagnostik hinaus auch für therapeutische Zwecke extrem nützlich, z. B. in der Onkologie zur aktiven Ansteuerung und Vernichtung von Krebszellen.^{120,154}

Im Fokus dieser Arbeit stand das aktive Targeting von Immunzellen durch Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs), um deren Schicksal mittels kombinierter $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT *in vivo* verfolgen zu können. PFCs wurden 2008 erstmalig gezielt für die Inflammationsbildgebung verwendet und seitdem in einer Vielzahl an inflammatorisch-assoziierte Krankheitsbilder, wie den Herzinfarkt, Artherosklerose oder auch einen Schlaganfall experimentell erprobt.^{82,86,155} Dafür werden PFCs in den Blutstrom injiziert, wo sie insbesondere von Monozyten/Makrophagen aufgenommen werden. Im Falle einer Inflammation wandern diese Zellen zum Entzündungsherd, woraufhin sie mittels ^{19}F -MRT hochspezifisch visualisiert werden können. Dadurch lassen sich die Zellen am Ort des Geschehens nachweisen und somit der inflammatorische *Hot Spot* hintergrundfrei darstellen. Ein Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass nicht eine spezifische Immunzellklasse sondern die Gesamtheit aller phagozytisch aktiven Zellen detektiert wird. Dies sind zwar größtenteils die Monozyten/Makrophagen, jedoch konnte auch unter bestimmten Bedingungen bei neutrophilen Granulozyten und *epicardium-derived cells* (EPDCs) eine PFC-Aufnahme nachgewiesen werden.^{131,156} Dementsprechend kann zwar der Entzündungsherd identifiziert werden, aber weitergehende Informationen, ob dort vorwiegend Granulozyten, M1- oder M2-Makrophagen oder sogar T-Zellen infiltriert sind, lassen sich mit dieser Technik nicht erfassen. Da die verschiedenen Immunzelltypen die nachfolgende Heilungsphase jedoch in unterschiedlicher Weise beeinflussen können, war das Ziel dieser Arbeit ein zellspezifisches PFC-Targeting zu etablieren, um die Art der Entzündung besser mittels ^{19}F -MRT einschätzen zu können und hiermit möglicherweise eine Prognose über den weiteren Heilungsverlauf zu erhalten.

8.1 Einfluss von Größe und Oberflächenbeschaffenheit auf die zelluläre

Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen

Um die Inflammationsbildgebung mithilfe von ^{19}F -MRT auf eine zellspezifischere Basis zu stellen und dadurch eine bevorzugte Beladung individueller Immunzellpopulationen zu erreichen, wurde zunächst untersucht, wie eine gezielte Veränderung der PFC-Oberfläche deren ‚passive‘ Aufnahme durch phagozytierende Zellen moduliert. Dazu wurde zum einen eine PEGylierung der Emulsionsoberfläche vorgenommen, zum anderen wurde die Größe der Emulsionspartikel verändert.

8.1.1 PEGylierung der PFC-Oberfläche reduziert die zelluläre Assoziation

Bereits in den frühen 90er-Jahren zeigten Blume und Cevc, dass das Einbringen von Poly-Ethylen-Glycol (PEG) in Emulsionen deutlich bessere Abschirmungseffekte aufweist, als das damals noch verwendete Gangliosid GM1.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Das Polymer kann in unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt werden, jedoch zeigen sich deutliche Abschirmungseffekte erst ab 2000 kDa.⁹⁹⁻¹⁰¹

Die PEGylierung von C^{fl} PFCs bzw. R^{ho} PFCs führte zu keinen wesentlichen Änderungen der Emulsioneigenschaften hinsichtlich Partikeldurchmesser und Größenverteilung, wie die Charakterisierung anhand von PCS (Photonen-Korrelations-Spektroskopie) ergab. Signifikante Veränderungen konnten lediglich im ζ -Potential ausgemacht werden, was zu erwarten war, da die PEGylierung für eine neutralere Oberfläche der Emulsion sorgt und somit die starke negative oberflächliche Ladung abschwächt.¹⁶⁰ Dementsprechend lassen sich die Änderungen im ζ -Potential nutzen, um auf den erfolgreichen Einbau der PEG-Ketten in die Emulsion rückzuschließen. Allerdings hat die PCS den methodischen Nachteil, dass die Partikeleigenschaften über die Brechung von Licht an den Emulsionsteilchen berechnet werden. Diese Art der Bestimmung kann, durch bei der Emulsionsherstellung entstandene Liposomen verfälscht werden, da diese zum einen kein Kontrastmittel enthalten und zum anderen deutlich kleiner als die Emulsionspartikel sind. Um den Liposomenanteil innerhalb der Präparationen zu bestimmen, wurden daher zusätzliche Kryo-TEM-Analysen (Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie) durchgeführt. Hier erscheinen Emulsionspartikel aufgrund des PFC-Kerns dunkel, die leeren Liposomen jedoch hell. Erfreulicherweise konnte mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden, dass der Anteil an Liposomen minimal und daher der Einfluss auf die Größenmessung sehr gering ist.

Um die Auswirkungen der PEGylierung auf die zelluläre PFC-Aufnahme zu bestimmen, wurde die Inkorporation der verschiedenen Emulsionen zunächst *in vitro* an CHO-Fibroblasten sowie J774- und RAW-Makrophagen untersucht. Bei Inkubation mit nicht-PEGylierten PFCs konnte bei den

Makrophagenlinien RAW und J774 eine starke Internalisierung der PFCs nachgewiesen werden. Dies entspricht den Erwartungen, da beide Zelllinien phagozytotische Eigenschaften besitzen. Im Gegensatz dazu ergab sich für CHO-Fibroblasten eine nur geringe, aber messbare PFC-Aufnahme. Da Fibroblasten keine phagozytotisch aktiven Zellen sind, werden die PFCs hier vermutlich über einen anderen Endozytoseweg aufgenommen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei primär isolierten Fibroblasten beschrieben.¹⁶¹

Interessanterweise konnte insbesondere bei den beiden Makrophagenlinien nach 24-stündiger PFC-Inkubation bei 37 °C ein starker Rückgang des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, hingegen zeigt sich bei Inkubation bei 4 °C eine stete Zunahme des Signals. Dies kann höchstwahrscheinlich durch einen Abbau der Fluorochrome erklärt werden. Bei 37 °C werden die Partikel in die Zelle internalisiert, wohingegen bei 4 °C nur eine oberflächliche Bindung, aber keine Internalisierung erfolgt. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sorgen reaktive Sauerstoffspezies, in diesem Fall H₂O₂, für eine stetige Minderung der Fluoreszenz, was auf eine oxidative Zerstörung der Fluorochrome zurückgeführt werden kann. Diese Annahme wird zusätzlich durch Vergleich der ¹⁹F-MRT- mit den Durchflusszytometer-Messungen nach 24-stündiger Inkubation gestützt: Bei allen drei Zelllinien konnte in den ¹⁹F-MRT-Bildern ein deutlich stärkeres Fluorsignal für die PFCs im Vergleich zu den PEG-PFCs ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Durchflusszytometer-Messungen zu diesem Zeitpunkt mehr Signal bei den PEG-PFCs als bei den PFCs. Der Perfluorkronenether ist im Vergleich zu den Fluorochromen ein inertes Molekül. Einmal in die Zelle aufgenommen, verbleibt es dort und es sind bisher keine chemischen Abbauprozesse beschrieben, welche die Perfluorkarbone abbauen können.^{68,162} Somit ist dies ein klarer Hinweis darauf, dass insbesondere das Carboxyfluorescein über längere Zeit instabil ist. Offenbar setzt der Verlust der Fluoreszenz hier sogar schon deutlich früher ein, da in den durchflusszytometrischen Messungen bereits nach 20-40 Minuten ein Rückgang in der Fluoreszenz zu beobachten ist. Somit sind für längere Versuchsansätze andere Fluorochrome, wie z. B. das Rhodamin vorzuziehen, wobei auch bei diesem über 24 Stunden hinweg ein signifikanter Verlust im Fluoreszenzsignal zu verzeichnen ist.

Wie erhofft, ergab sich bei den Experimenten mit PEG-PFCs in allen drei Zelllinien eine starke Reduktion der Partikelaufnahme im Vergleich zu den normalen PFCs. Der genaue Mechanismus, wie dieser PEG-Effekt zustande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt, doch gibt es hierfür verschiedene Hypothesen: Ein wichtiger Faktor stellt sicherlich die Veränderung des ζ-Potential durch den Einbau des PEG in Lipidoberfläche der Emulsionen dar. Sowohl ein negatives als auch positives ζ-Potential führen zu einer verstärkten Aufnahme durch Zellen, wohingegen neutrale Werte diese verringern.¹⁶³ Zudem wird durch eine PEGylierung der Emulsionen auch die Bindung von Serumproteinen an die Nanopartikel und somit die Ausbildung einer Proteincorona vermindert. Dabei

fungieren die PEG-Ketten wie eine Art Feder. Falls eine Bindung von Proteinen erfolgt, wird die PEG-Kette gestaucht – die dabei aufgenommene Energie wird anschließend durch Abstoßung des Protein wieder abgegeben.⁹⁸ Dementsprechend kommt die PEG-Abschirmung erst ab einer bestimmten Menge an inkorporiertem PEG zum Tragen. Bei zu geringem PEG-Gehalt sind die einzelnen PEG-Ketten zu weit voneinander entfernt, um diesen Abstoßungseffekt zu erbringen, was als *mushroom conformation* bezeichnet wird. Ist die PEG-Menge jedoch zu hoch, geht die Flexibilität der einzelnen Ketten durch die zu hohe Dichte an PEG verloren, wofür der Term *brush conformation* verwendet wird.¹⁰² Die optimale Abstoßungskonformation wird bei 5 mol% PEG erreicht – ein Zustand der zwischen *mushroom* und *brush* liegt^{99–101} und eine ideale Kombination von Grundstarre und genügender Flexibilität aufweist.

Des Weiteren führt die PEGylierung auch zur Ausbildung einer Hydrathülle, die die Bindung von Serumproteinen erschwert.¹⁶⁴ Zu dieser Form der Proteine werden u. a. C3-, C4- und C5- sowie C-reaktives Protein oder auch Fibronectin gezählt.¹²⁸ Bis auf Fibronectin handelt es sich bei allen um Akute-Phase-Proteine, welche nach einer Entzündung hochreguliert werden und an Pathogene binden. Insbesondere C5a, also die aktivierte Form des C5, ist hochpotent und der bindende Rezeptor ist zwischen $0,5\text{-}3 \times 10^5$ -fach auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten vorhanden.¹⁶⁵ Allerdings ist die Phase, in der es zur Ausbildung der Proteincorona kommt, nur rudimentär erforscht und gerade im Hinblick auf PFCs gibt es bislang keine systematischen Untersuchungen hierzu. Die aktuell vorherrschende Meinung ist, dass sich innerhalb kurzer Zeit eine *hard* Corona ausbildet, indem zunächst Proteine mit hoher Affinität binden. Um diese herum binden weitere Proteine mit geringerer Affinität und bilden die *soft* Corona. Diese ist zusätzlich im ständigen Austausch mit umgebenden Proteinen.^{166,167}, was es sehr schwierig macht, die Proteine der *soft* Corona zu charakterisieren.

Welcher dieser Effekte letztlich für die verringerte ^{PEG}PFC-Aufnahme verantwortlich ist, müssen weitere Untersuchungen klären – sehr wahrscheinlich werden aber alle oben diskutierten Mechanismen zusammen für die sichtbaren Abschirmungseffekte sorgen. Die hier beobachteten Auswirkungen der PEGylierung auf die zelluläre PFC-Aufnahme sind im Wesentlichen in guter Übereinstimmung mit PEG-Studien zur Aufnahme von Liposomen sowohl *in vitro* für J774-Makrophagen als auch *ex vivo* für humane Monozyten.^{98,168} Ähnliche Effekte konnten bei SPIOs (*super paramagnetic iron oxide particles*) beobachtet werden, bei denen es sich um kleine Nanopartikel (<100 nm) mit einem Eisenkern handelt, welche in der MR-Bildgebung für einen Negativkontrast sorgen – auch bei diesen Partikeln führte eine PEGylierung zu einer verringerten SPIO-Aufnahme in J774-Makrophagen.¹⁶⁹

Die an den immortalisierte Zelllinien *in vitro* erhaltenen Ergebnisse konnten anschließend an primären murinen Immunzellen *ex vivo* bestätigt werden. Wie angestrebt, führte die PEGylierung zu einer

massiven Reduktion der PFC-Inkorporation durch neutrophile Granulozyten, klassische und nicht-klassische Monozyten. Da insbesondere die zirkulierenden Immunzellen in direktem Kontakt mit Serumproteinen stehen, wurden hier zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, um den Effekt der damit verbundenen Coronabildung auf die PFC-Aufnahme zu adressieren. Interessanterweise ergab sich dabei bei Inkubation in Vollblut eine deutlich langsamere Aufnahmekinetik als in Protein-reduziertem MACS-Puffer.

Hierfür kann es verschiedene Erklärungen geben: Zum einen ist im ersten Fall das Verhältnis von Immunzelle zu PFC-Partikel deutlich geringer, da im Vollblut eine Vielzahl anderer Zellen (Erythrozyten, Thrombozyten) vorhanden sind, die zumindest durch passive Adhäsion die effektive, freie PFC-Konzentration herabsetzen. Zum anderen ist denkbar, dass im Vollblut Serumproteine vorhanden sind, die die PFC-Aufnahme verzögern, indem sie zu einer Modifikation der *hard* Corona führen, für die sich in den letzten Jahren zunehmend herauskristalliert hat, dass sie – neben Partikelladung und Größe – eine Schlüsselrolle für die Partikelaufnahme in die Zelle spielt. So konnte z. B. gezeigt werden, dass sich die *hard* Corona von Siliciumdioxid- und Polystyrol-Nanoemulsionen deutlich voneinander unterscheiden¹⁶⁷ und dass auf der anderen Seite die Verwendung von hitzeinaktiviertem Serum die zelluläre Partikelaufnahme drastisch verändert.¹⁷⁰ Offenbar ist die Ausbildung der *hard* Corona so komplex, dass man im Prinzip für jede Emulsion die bindenden Proteinfractionen bestimmen müsste, da selbst geringfügige Änderungen der Oberflächenbeschaffenheit Einfluss auf die Coronabildung nehmen können. Erstaunlicherweise ist die initiale PFC-Aufnahme bei Inkubation in MACS-Puffer relativ hoch, obwohl dort nur BSA als Proteinzusatz sowie EDTA als Komplexbildner vorhanden sind. In diesem Zusammenhang konnte bereits durch Messungen des ζ -Potential vor und nach Inkubation mit BSA gezeigt werden, dass dieses spontan an Gold-Nanopartikel bindet.¹⁷¹ Allerdings ist nicht bekannt, ob BSA auch die Aufnahme der Nanopartikel in Zellen fördert – da BSA das ζ -Potential senkt und somit die Bindung an Zellen verringert, wäre eher das Gegenteil zu erwarten.¹⁷¹ Zur Klärung dieser zum Teil überraschenden Befunde bieten sich weiterführende Experimente mit Puffern ohne jeglichen Proteinzusatz an.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen eindeutig, dass sich die Aufnahme der PFCs durch Immunzellen mittels PEGylierung der Partikeloberfläche substantiell reduzieren lässt. Bislang gab es hierfür lediglich indirekte Evidenz: In zahlreichen Studien wird zwar eine verlängerte Bluthalbwertszeit von PEGylierten Nanopartikeln *in vivo* beschrieben; es wurde jedoch nicht gezeigt, dass diese verlängerte Halbwertszeit auch tatsächlich durch eine verminderte Immunzell-Aufnahme bedingt ist und nicht hauptsächlich durch eine verringerte Aufnahme durch Leber und Milz zustande kommt.^{124,126,127,157,172}

8.1.2 Einfluss der Partikelgröße auf die zelluläre Aufnahme von PFCs

Alle Aufnahmeprozesse in die Zelle werden unter dem Überbegriff Endozytose zusammengefasst, welche grob in Pinozytose und Phagozytose unterteilt wird. Letztere wird erst ab einer Partikelgröße von ca. 250 nm Durchmesser stimuliert und weist die höchste Aufnahmekapazität auf.¹⁷³ Die Pinozytose wird wiederum in Makropinozytose, Clathrin-abhängige, Clathrin-unabhängige sowie Caveolae-abhängige Endozytose untergliedert. Wann welcher dieser Wege aktiviert wird, ist bisher nicht im Detail erklärt, jedoch spielt unter anderem auch hier die Partikelgröße eine wichtige Rolle für den Aktivierungsweg. So handelt es sich bei Caveolae um etwa 50-100 nm große Membraneinstülpungen, welche auf Fibroblasten, Endothelzellen oder auch glatter Muskulatur, aber interessanterweise nicht auf Leukozyten vorzufinden sind. Ein negatives ζ -Potenzial fördert die Aufnahme von Partikeln über Caveolae und führt zu deren Lokalisation in Caveosomen.¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ Sowohl bei der Clathrin-abhängigen als auch Clathrin-unabhängigen Endozytose handelt es sich um etwa 150 nm große Membranabschnürungen, wohingegen bei der Makropinozytose, ähnlich wie bei der Phagozytose, größere Partikel aufgenommen werden, bis hin zu mehreren Mikrometern. Die Makropinozytose spielt insbesondere bei der Aufnahme von Zelldebris, Viren und Bakterien eine Rolle, ist aber vermutlich für die Aufnahme von Nanopartikeln von untergeordneter Bedeutung.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Eine Übersicht der unterschiedlichen Endozytosewege ist in Abbildung 8.1 gegeben.

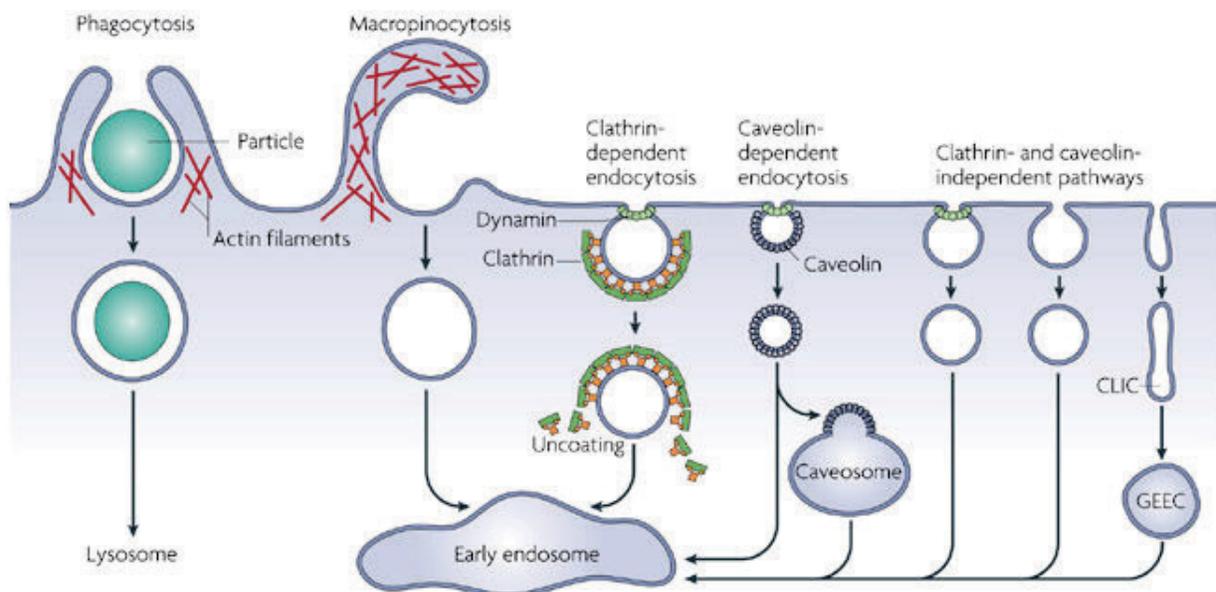


Abbildung 8.1: Überblick über die unterschiedlichen Endozytosewege in die Zelle.

Grob gegliedert wird die Endozytose in Phagozytose und Pinozytose. Die Pinozytose wiederum teilt sich auf in Makropinozytose, Clathrin-abhängige sowie Clathrin-unabhängige Endozytose und die Caveolae. Diese wiederum können wieder in unterschiedliche Untergruppen, je nach beteiligtem Proteinkomplex, untergliedert werden. (Modifiziert nach Mayor und Pagano)

Um zu überprüfen, wie der Durchmesser der PFCs deren zelluläre Aufnahme beeinflusst, wurden Emulsionen mit unterschiedlicher Menge an Lipid hergestellt (35 mM; 17,5 mM; 3,5 mM). Dabei ging die Verringerung des Lipidgehaltes erwartungsgemäß mit einer Erhöhung der Partikeldurchmesser einher. Zusätzlich wurden alle Emulsionen mittels SPIT (Sterol-basierte post-Insertionstechnik) mit 5 mol% Cholesterol-PEG₂₀₀₀ PEGyliert, wonach sich überraschenderweise deutlich negative ζ -Potenziale einstellten. Wie bereits oben diskutiert, würde man eher erwarten, dass die PEGylierung zu einer neutraleren Oberflächenladung führt. Es ist zwar bekannt, dass Cholesterol die Rigidität der Membran erhöht sowie auch die Membranpermeabilität reduziert,¹⁸²⁻¹⁸⁴ jedoch sind keine Studien bekannt, welche nahelegen, dass Cholesterol auch nachweislich einen Effekt auf das ζ -Potenzial ausübt.

Die Aufnahme dieser Emulsionen wurde zunächst in den auch zuvor verwendeten Zellkulturlinien untersucht. Dabei konnte generell mit steigendem Durchmesser der Emulsionen eine stärkere Partikelaufnahme in die Zellen beobachtet werden. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass, je nach Größe der Partikel, unterschiedliche Endozytosewege aktiviert werden. Partikel um die 100 nm werden vermutlich über Clathrin-abhängige oder Clathrin-unabhängige Endozytose internalisiert, wie bereits für PLA-PEG- (Poly-lactide-co-Polyethyleneglycol) als auch PLGA-Partikel (Poly-lactide-co-glycolide) beschrieben wurde.^{185,186} PFCs mit einer Größe von 150 nm werden aufgrund des geringen Größenunterschieds mutmaßlich ebenfalls durch Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert, was erklären könnte, warum die Aufnahmeunterschiede zwischen diesen beiden Größen nicht besonders ausgeprägt waren. Demgegenüber ist bei den ²⁵⁰PFCs davon auszugehen, dass diese Partikel über Phagozytose aufgenommen werden, was durch die massive und schlagartige Internalisierung in diesem Fall untermauert wird.

Die hier für die PFCs beobachteten Effekte stehen im Einklang mit früheren Befunden für andere Nanopartikeln. Bereits 1986 konnten Pratten und Loyd zeigen, dass Polystyrol-Emulsionen mit steigendem Partikeldurchmesser verstärkt in Peritonealmakrophagen von Ratten aufgenommen werden.¹⁸⁷ Ähnliche Effekte wurden sowohl für die Liposomen-Aufnahme in Alveolarmakrophagen als auch deren Ablagerung in artherosklerotische Läsionen beschrieben.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Um den tatsächlichen Endozytoseweg der PFCs in die Zellen zu klären, könnte man Endozytosehemmer verwenden und anschließend die Aufnahme bestimmen. Chlorpromazin ist ein Hemmer der Clathrin-abhängigen Endozytose, ebenso wie kaliumfreier Puffer.^{191,192} Für die Clathrin-unabhängige Endozytose bietet sich sowohl Methyl- β -cyclodextrin als auch Genistein an.^{193,194} Allerdings bestehen hierfür z.T. starke Vorbehalte, da die eingesetzten Endozytosehemmer je nach Zelle unterschiedlich wirken und daher immer auf den verwendeten Zelltyp optimiert werden müssen.¹⁹⁵

Auch bei den Untersuchungen zur größenabhängigen PFC-Internalisierung konnte durch PEGylierung für jeden Durchmesser und in allen Zelllinien die Aufnahme reduziert werden, wobei allerdings das Ausmaß dieses Effekts deutlich geringer ausfiel als im vorherigen Kapitel. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass hier das ζ -Potenzial nur einen geringen Unterschied zwischen PFC- und PEG-PFC-Emulsionen aufwies, was wiederum in der Art und Weise begründet sein könnte, mit der die PEGylierung vorgenommen wurde: Die PEGylierung über die SPIT setzt einen spontanen Einbau der Cholesterolgruppen in die Emulsion voraus, jedoch wurde nicht überprüft, wie effizient dieser Einbau erfolgt. Eine anschließend durchgeführte Titrationsreihe mit unterschiedlichen Mengen an Cholesterol-PEG₂₀₀₀ ergab kontinuierlich verbesserte Abschirmungseffekte bis zu einem PEG-Gehalts von 75 mol%, wobei unklar ist, ob wirklich die gesamte Menge des PEG in die Emulsion integriert. Daher wäre es wünschenswert, den tatsächlichen PEG-Gehalt der Emulsion zu bestimmen. Hierfür stehen für zukünftige Untersuchungen verschiedene Methoden zu Verfügung: Ältere Verfahren beinhalten den Einsatz von Neblers bzw. Dragendorffs Reagenz. Bei ersterem wird alkalische Kaliumtetraiodomercuratlösung zur Detektion verwendet, bei letzterem handelt es sich um eine aus der Forensik stammenden Methodik, welche sich zur absoluten Quantifizierung des PEG eignet.^{196,197} Mittels Bariumionen lässt sich sogar der DSPE-PEG-Gehalt in Liposomen quantifizieren.¹⁹⁸

Schließlich wurde das Verhalten der unterschiedlichen Emulsionen unter *in vivo* Bedingungen in der Maus untersucht. Dabei stand zum einen der Einfluss der Partikelgröße auf die Inflammationsbildung als auch auf die Biodistribution der PFCs im Vordergrund des Interesses, da für andere Nanopartikelsysteme bereits gezeigt wurde, dass der Partikeldurchmesser entscheidenden Einfluss auf die Gewebeverteilung hat. Für Mikrosphären ist bekannt, dass Partikel kleiner 5000 Dalton (dies entspricht etwa 1 nm) direkt über das renale System ausgeschieden werden¹⁹⁹ und Partikel unter 200 nm zudem deutlich langsamer aus dem Blutkreislauf entfernt werden als Partikel größer als 200 nm.¹⁹⁹ Nach Injektion in den Blutstrom, werden diese binnen Minuten vom MPS (mononukleäre Phagozytose System) erkannt und von Leber und Milz aufgenommen,^{200–202} wobei sich kleinere Partikel (<150 nm) verstärkt im Knochenmark ansammeln, wohingegen größere Partikel (>250 nm) primär in Leber und Milz akkumulieren.²⁰³

Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen auch für die PFCs bestätigt werden. Nach intravenöser PFC-Gabe ergaben repetitive ¹⁹F-MRT-Messungen, dass sich die Bluthalbwertszeit mit steigender PFC-Größe deutlich verkürzt: Bei ²⁵⁰PFCs ließ sich bereits nach 1 Stunde kaum noch Signal im Blut ausmachen. Demgegenüber wiesen die beiden größeren PFCs (¹⁵⁰PFCs, ²⁵⁰PFCs) eine deutlich stärkere Akkumulation in Leber und Milz auf, was sich mit der Annahme deckt, dass größere Partikel schneller vom MPS erkannt und daher auch effektiver aus dem Blutkreislauf entfernt werden.¹⁹⁹

Bei diesen Untersuchungen konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass auch *in vivo* die Aufnahme der PFC-Partikel durch Immunzellen mit steigendem Durchmesser zunimmt. Allerdings zeigte sich bei Verwendung des Matrigel-Inflammationsmodells in der ^{19}F -MRT Bildgebung unerwartet ein komplett anderes Ergebnis: Hier wurde mit steigendem Durchmesser der Emulsionspartikel weniger ^{19}F -Signal im Matrigel detektiert. Darüber hinaus konnte nach Isolation der Immunzellen aus dem Matrigel so gut wie kein Fluoreszenzsignal festgestellt werden. Wenn diese allerdings nach der Isolation mit den Partikeln inkubiert wurden, stellte sich das gewohnte Bild ein: Mit steigendem Durchmesser der Partikel ging eine stärkere PFC-Aufnahme einher, was bestätigt, dass die Zellen *per se* nicht in ihrem normalen Aufnahmeverhalten kompromittiert waren.

Diese – auf den ersten Blick überraschenden – Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich auf zwei unterschiedliche Ursachen zurückzuführen: Die Isolation der Immunzellen aus dem Matrigel und die anschließende Analyse des Fluoreszenzsignals erfolgte erst 12 Stunden nach Applikation der PFCs – ein Zeitraum, bei dem in der Zellkultur bereits der Abbau der Fluorophore festzustellen war. Dieser Effekt scheint offenbar unter *in vivo* Bedingungen noch erheblich stärker zum Tragen zu kommen, was zusätzlich durch die Beobachtung gestützt wird, dass bereits 1 Stunde nach intravenöser Gabe im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen nur ein extrem schwaches Fluoreszenzsignal für die Immunzellen beobachtet werden konnte (~ Faktor 100 geringer, Abb. 7.15).

Demgegenüber beleuchtet das mit steigender Partikelgröße abnehmende ^{19}F -Signal im Matrigel/LPS-Depot ein wichtiges Problem, welches sich generell bei der *in vivo* Inflammationsbildung stellt: Die unspezifische Akkumulation des Kontrastmittels im Entzündungsherd durch den EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*). Im betroffenen Areal führen Entzündungen immer zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels, um z.B. den Immunzellen die Einwanderung in den inflammatorischen Bereich zu ermöglichen.^{204,205} Gleichzeitig bedingt dieses löchrige Endothel aber auch, dass Kontrastmittel aus dem Blutstrom in das Interstitium diffundieren können und sich so im tiefer liegenden Gewebe ansammeln. Dort verbleiben sie und werden nur sehr langsam wieder ausgewaschen, was als EPR-Effekt bezeichnet wird. Dementsprechend kann bei Detektion eines ^{19}F -Signals nicht zweifelsfrei zwischen einwandernden, mit PFCs beladenen Immunzellen und freien Partikeln im Interstitium unterschieden werden. Der Rückgang des ^{19}F -Signals mit steigender Partikelgröße deutet darauf hin, dass die passive Deposition der PFCs abnimmt, da die Emulsionen zu groß sind, um durch das Endothel zu diffundieren. Bisherige Untersuchungen zu dieser Thematik beschränkten sich nur auf wesentlich kleinere Nanopartikelsysteme. Interessanterweise wurde bei Steigerung des Molekulargewichts von 10^4 auf 10^6 (entspricht in etwa 4-7 nm) eine Zunahme des EPR-Effekts beobachtet.²⁰⁶ Des Weiteren wurde in einer Tumorstudie die stärkere Signalauslöschung durch SPIOs im Bereich von 20-40 nm auf einen Anstieg des EPR-Effekts zurückgeführt.²⁰⁷ Literaturdaten zu

Nanopartikeln in der hier verwendeten Größe sind bislang nicht verfügbar, daher ist durchaus denkbar, dass der Effekt wieder abnimmt, wenn die Partikel- die Porengröße im Endothel überschreitet. Dies gilt insbesondere für den in dieser Arbeit artifiziell erzeugten Entzündungsherd, der ein relatives mildes Inflammationsmodell darstellt, wohingegen ein Tumor vermutlich deutlich stärkere Effekte auf das Endothel ausübt und daher auch zu größeren Löchern führt.

Insgesamt legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass sich – zumindest in dem hier untersuchten Größenbereich – mit zunehmender Partikelgröße die zelluläre PFC-Aufnahme steigern und zugleich der EPR-Effekt reduzieren lässt. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob sich dies in physiologisch relevanteren Entzündungsmodellen bestätigt. Zur Abgrenzung des EPR-Effektes könnten dabei frühere Messzeitpunkte nach PFC-Injektion herangezogen werden. Da der EPR-Effekt auf reiner Diffusion beruht, sollte in der initialen Phase nach PFC-Gabe (z. B. nach 1 Stunde) bereits der Großteil der Emulsionen im Inflammationsbereich vorliegen und der anschließende Zuwachs im ^{19}F -Signal (z. B. nach 24 Stunden) die Infiltration PFC-beladener Immunzellen widerspiegeln.

8.2 Detektion spezifischer Zellpopulationen über das aktive Targeting von PFCs

Nachdem im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, dass über Veränderung der PFC-Oberflächeneigenschaften (PEGylierung) bzw. der Partikelgröße deren zelluläre Aufnahme ganz allgemein verringert bzw. erhöht werden kann, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit ein aktives PFC-Targeting an individuelle Zellpopulationen etabliert werden. Hierfür wird ein hochspezifischer Ligand benötigt, wobei normale Antikörper oft den Nachteil haben, dass ihr Epitop auf unterschiedlichen Zelltypen vorhanden ist. Zudem kann der F_c -Teil des Antikörpers zur Komplementaktivierung führen.⁶⁹ Eine Alternative zu Antikörpern sind Antikörperfragmente, *single-chain* Antikörper oder Nanobodies. Sie alle haben den Vorteil, dass sie deutlich kleiner sind und zudem zu keiner Aktivierung des Komplementsystems führen.^{208–211} Insbesondere bei den Nanobodies handelt es sich um eine sehr interessante Alternative zu herkömmlichen Antikörpern, da diese aus einer monomeren variablen Domäne bestehen und daher nur ein Molekulargewicht von ca. 10–15 kDa aufweisen.^{212,213} Darüber hinaus eignen sich auch kleine Peptide für spezifische Targetingansätze. Allerdings ist die Affinität zum Antigen häufig geringer als bei Antikörpern. Peptide können in linearer oder auch zyklischer Struktur vorliegen, wobei die lineare Form weniger anfällig gegenüber chemischen Modifikationen ist.²¹⁴

8.2.1 Aktives Targeting von humanen Granulozyten

Der erste Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich mit dem aktiven Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten. Hierfür wurden als spezifische Liganden Peptide verwendet, deren Sequenz bereits 1999 mittels eines Phagendisplays identifiziert wurden.¹³⁴ Peptide haben gegenüber normalen Antikörpern den Vorteil, dass sie nur ein Epitop binden und nicht wie polyklonale Antikörper unterschiedliche Bindungsepitope aufweisen. Zudem lassen sie sich sehr einfach modifizieren, was in dieser Arbeit genutzt wurde, um die eingesetzten Peptide für Fluoreszenzmessungen N-Terminal mit einem Carboxyfluorescein auszustatten. Des Weiteren wurde hinter einem Triple-Glycin-Spacer ein zusätzliches Cystein eingebaut, dessen freie Sulfhydrylgruppe für Kopplungsreaktion genutzt werden kann.

In durchflusszytometrischen Messungen konnte nach den oben beschriebenen Modifikationen die Bindung von NG2 an eine Teilpopulation der Granulozyten bestätigt werden, wohingegen NG1 nicht, wie beschrieben, an alle Granulozyten bindet. Möglicherweise weist das abgewandelte NG1 eine veränderte Tertiärstruktur auf, so dass keine Bindung mehr an die Granulozyten erfolgt. Zudem muss berücksichtigt werden, dass für die NG1 Aminosäuresequenz eine Bindung an die humane U937-Monozytenlinie beschrieben wurde.¹³⁴ Dementsprechend wäre selbst bei gegebener Funktionalität des Peptids fraglich, ob nicht auch eine Bindung an Blutmonozyten erfolgt und somit keine reine Spezifität für Granulozyten gegeben ist. NG2 hingegen bindet trotz der chemischen Modifikationen etwa 50 % der humanen Granulozyten. Zudem konnte durch den Einsatz von pH-Rodo-markiertem NG2 nachgewiesen werden, dass das Peptid nicht nur an Granulozyten bindet sondern auch von diesen internalisiert wird. Dies spielt für das angestrebte aktive Targeting eine entscheidende Rolle, da die Internalisierung des NG2 eine Prämisse dafür ist, dass später auch die an das Peptid gekoppelten Kontrastmittel in die Zellen aufgenommen werden können.

Als Bindepartner für das NG2 konnte mittels *Ligand-Receptor-Capturing* CD177 identifiziert werden. Interessanterweise wurden in der Sequenz des NG2 Homologien zu Integrinen ausgemacht, insbesondere den darin enthaltenen Asparagin- und Leucin-Abschnitten, was sich mit Literaturdaten zur Assoziation von CD177 mit β 2-Integrinen, insbesondere Mac-1, deckt.²¹⁵⁻²¹⁷ Die genaue Funktion von CD177 ist noch unklar, aber es wurde u. a. gezeigt, dass es für eine Oberflächenexponierung der Serin-Protein-Protease (PR3) sorgt. Dies hat zur Folge, dass ausschließlich CD177⁺ Granulozyten eine Oberflächenexpression dieser Protease aufweisen.²¹⁸ In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass CD177⁺ Granulozyten *in vitro* besser durch eine Schicht von HUVEC-Zellen migrieren,²¹⁹⁻²²¹ wobei PR3 vermutlich eine entscheidende Rolle zukommt, da Serin-Protease-Inhibitoren für eine verringerte Migration sorgen.²²¹ Allerdings konnte *in vivo* keine verstärkte Migration von CD177⁺

Granulozyten in inflammatorische Bereiche nachgewiesen werden und auch bei CD177-defizienten Mäusen konnte kein Einfluss auf die Migration der Granulozyten beobachtet werden.^{217,222,223}

Um festzustellen, ob sich mithilfe des identifizierten Peptids unter pathologischen Bedingungen Veränderungen im Granulozytenprofil nachweisen lassen, wurden zunächst Blutproben gesunder Donoren bzw. Patienten nach einem Myokardinfarkt mit NG2 inkubiert. Dabei ergab sich der spannende Befund, dass sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C eine stärkere Bindung des NG2 an die Proben der Myokardinfarktpatienten erfolgt. Da das Verhältnis zwischen 4 °C und 37 °C in beiden Gruppen gleich blieb, liegt der Schluss nahe, dass CD177 nach Infarkt verstärkt exprimiert oder zur Oberfläche transportiert wird, es jedoch zu keiner vermehrten Internalisierung des Rezeptors kommt. In separaten Experimenten konnte auch nach Stimulation von Granulozyten gesunder Spender mit LPS eine verstärkte Bindung des NG2 beobachtet werden. Dies ist insoweit bedeutsam, da es sich bei einem Myokardinfarkt um eine sterile Inflammation handelt, durch LPS jedoch eine nicht-sterile Inflammation getriggert wird und sich daher die beiden Konditionen in ihrer Immunantwort deutlich unterscheiden. Zudem fiel bei Charakterisierung der NG2^{+/-}-Granulozyten die NG2⁺-Population durch eine geringere Expression von CD14 auf. Dieses Protein bildet zusammen mit TLR4 den Rezeptor für LPS²²⁴ und wird im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife in Gegenwart von LPS verstärkt an die Zelloberfläche transportiert.²²⁵ In diesem Zusammenhang wäre es interessant nachzuprüfen, ob eine Behandlung mit LPS auch bei neutrophilen Granulozyten von STEMI-Patienten zu einer erhöhten Bindung von NG2 führt.

Auch nach Kopplung des NG2 an PFCs blieb die Spezifität der Peptidbindung erhalten: Inkubation von Granulozyten mit ^{NG2}PFCs führte zu einer starken Internalisierung, wohingegen PFCs mit einem Kontrollpeptid kaum aufgenommen wurden. Des Weiteren konnten die verstärkte Affinität der Granulozyten von STEMI-Patienten für das Peptid ebenso für ^{NG2}PFCs bestätigt werden. Auch in Gegenwart von Monozyten wurden die ^{NG2}PFCs bevorzugt von Granulozyten aufgenommen. Dies ist insbesondere für spätere Fluormessungen vorteilhaft, da Granulozyten im humanen System deutlich häufiger vertreten sind als Monozyten und somit zu einem vielfach stärkeren Fluorsignal führen. Gegebenenfalls ließe sich die Aufnahme durch Monozyten mit einem höheren Anteil an PEG noch weiter vermindern, was allerdings auch die Targetingeffizienz an die Granulozyten beeinflussen könnte – ein solcher Effekt wurde beim aktiven Targeting von HUVECs mittels eines RGD-Peptides beobachtet: Hier war die Ratio aus Targeting- und Kontroll-Emulsion bei geringen PEG-Mengen am höchsten und nahm mit steigendem PEG-Anteil ab.¹⁰³ Eine Alternative wäre die Kopplung von CD47 an die Emulsionen. CD47 ist als ein „don't eat me“ Signal für Monozyten beschrieben und verhindert

die Phagozytose.²²⁶ Möglicherweise könnte die Kombination aus PEGylierung und CD47 für die besten Abschirmungseffekte sorgen und damit die Spezifität noch weiter erhöhen.

Die Spezifität des Ansatzes wurde weiterhin anhand eines Inhibitionsassays getestet. Interessanterweise wird durch Vorinkubation mit einer hohen Menge an Peptid auch die Aufnahme durch Monozyten reduziert, obwohl das Peptid keinerlei Spezifität gegenüber Monozyten aufweist und daher auch keinen Einfluss auf die Aufnahme der Emulsionen haben sollte. Hier spielen offenbar andere, unspezifische endozytotische Aufnahmewege eine Rolle. Aufgrund der geringen Größe der Peptide ist eine Aufnahme durch Caveolae-abhängige Pinozytose denkbar. Wie dies aber im Weiteren die Aufnahme der ^{NG2}PFCs inhibiert, ist völlig unklar. Unter Umständen sind die Monozyten durch das Peptid bereits so stark abgesättigt, dass die Phagozytose eingeschränkt wird.

Um auszuschließen, dass die Bindung von NG2 in einer Stimulation der Zellen und der Aktivierung von Signalkaskaden resultiert, wurde die Expression verschiedener Oberflächenaktivitätsmarker (CD11b, CD63, CD66b) überprüft sowie ein ROS-Assay durchgeführt. Im Gegensatz zur Positivkontrolle LPS, führte die Inkubation mit ^{NG2}PFCs zu keinerlei Veränderungen bei CD11b, CD63 und CD66b. Hier muss einschränkend angemerkt werden, dass die Messungen nach nur 1 Stunde Exposition erfolgten und Langzeiteffekte nicht ausgeschlossen werden können. Auf der anderen Seite konnten in den ROS-Assays auch über 24 Stunden hinweg keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollbedingungen beobachtet werden.

Da Granulozyten zu den ersten Zellen gehören, die in inflammatorische Bereiche einwandern und dort Zelltrümmer und Matrixbestandteile entfernen,^{9,26} wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob deren migratorisches Verhalten durch die Markierung mit ^{NG2}PFCs beeinflusst wird. Mithilfe eines Migrationsassays konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindung und Inkorporation der ^{NG2}PFCs keinen signifikanten Einfluss auf die Migration der Granulozyten nimmt. Allerdings wurde auch hier der Assay nur über eine Stunde und bei einer Emulsionskonzentration vorgenommen. Weitere Analysen müssen klären, ob möglicherweise zu bestimmten Zeitpunkten bzw. Stoffmengen eine Sättigung einsetzt und dies sich dann auf die Migration auswirkt. Zumindest decken sich die Ergebnisse aus den Migrations- und Aktivierungsassays, da eine verringerte Migration auch durch eine verminderte Expression von Oberflächenmarkern wie CD11b gekennzeichnet wäre.

Interessanterweise wurden bei den Migrationsstudien für Granulozyten von STEMI-Patienten eine deutlich stärkerer Chemotaxis gegenüber IL-8 als bei Zellen von gesunden Probanden beobachtet. IL-8 ist eines der wichtigsten Chemokine für neutrophile Granulozyten und kann sowohl an CXCR1 als auch CXCR2 binden. CXCR2 ist primär für die Freisetzung der Granulozyten aus dem Knochenmark

verantwortlich, wohingegen die Signaltransduktion über CXCR1 mit dem Migrationsverhalten der Zellen in Verbindung steht.³²⁻³⁴ Mittels Oberflächenexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl der CXCR1, als auch der CXCR2 verstärkt auf Granulozyten von Patienten nach einem Myokardinfarkt vorkommt. In älteren Studien konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu anderen GPCRs sowohl CXCR1 als auch CXCR2 nach Bindung eines Liganden nicht internalisiert werden und es somit auch zu keinen starken Änderungen in der Oberflächenexpression kommen sollte.²²⁷ Dies stützt die These, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer verstärkten Expression der beiden Rezeptoren kommt. Die von IL-8 ausgelöste Signalkaskade führt letztendlich zur Phosphorylierung der MAPK ERK1/ERK2, wobei bemerkenswert ist, dass bei den Granulozyten von STEMI-Patienten bereits eine deutliche erhöhte Phosphorylierung von ERK1/ERK2 verzeichnet wurde, bevor die Zellen mit IL-8 in Kontakt kamen. Offenbar ist hier nach Infarkt eine Voraktivierung oder eine Art Priming erfolgt, da sich neutrophile Granulozyten in der Peripherie normalerweise in einem inaktiven Status befinden, um vor ungewollter Aktivität dieses Zelltyps zu schützen.²²⁸ Zur effektiven Bekämpfung eindringender Pathogene oder eines Entzündungsherds, müssen die Granulozyten daher zunächst geprimed, also gegenüber Aktivierungsmarkern sensibilisiert werden.²²⁹⁻²³¹ Dieses Priming kann über verschiedene Stimuli geschehen z. B. durch proinflammatorische Cytokine, Chemokine oder auch DAMPs. So reichen bereits einige Sekunden Kontakt zu ATP aus, um Granulozyten vorzuaktivieren. Alternativ können auch Stimuli wie LPS oder GM-CSF über einen längeren Zeitraum hinweg für das Priming der Zellen sorgen.²³²⁻²³⁶ Allerdings senkt eine Vorbehandlung mit GM-CSF die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gegenüber IL-8 deutlich herab – werden hingegen IL-8 und GM-CSF zusammen als Chemoattraktant verwendet, steigert dies die Migration im Vergleich zu IL-8 als alleinigem Stimulus.²³⁷ Da bei den Granulozyten von STEMI-Patienten eine erhöhte Migration gegenüber IL-8 festzustellen war, kann also GM-CSF als Priming ausgeschlossen werden. Da es nach Myokardinfarkt zum Absterben von Zellen und damit zur Freisetzung von ATP kommt, stellt insbesondere dieses Molekül einen wahrscheinlichen Primingfaktor dar. Zur weiteren Klärung dieser Frage müssten Blutproben gesunder Donoren und Patienten nach einem Myokardinfarkt systematisch hinsichtlich der Plasmaspiegel verschiedener Chemokine und anderer Stimuli untersucht werden.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass sich mithilfe von ^{NG2}PFCs spezifisch CD177⁺ Granulozyten mittels ¹⁹F-MRT sichtbar machen lassen, ohne dass die Zellen in ihrem normalen Phänotyp beeinflusst werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Granulozyten von STEMI-Patienten eine erhöhte Affinität zu ^{NG2}PFCs und gleichzeitig eine deutlich stärkerer Chemotaxis gegenüber IL-8 als Zellen von gesunden Probanden aufweisen.

8.2.2 Aufbau und Etablierung eines Cargo *Internalization* Rezeptor (CIR) Systems

Beim Cargo-Internalisierungs-Rezeptorsystem (CIR) handelt es sich um drei artifizielle Rezeptoren, welche extrazellulär identisch aufgebaut sind, aber unterschiedliche intrazelluläre Domänen und Internalisierungsmotive besitzen. Der extrazelluläre Bereich besteht aus einem GFP-Nanobody, welcher hochspezifisch GFP bindet.¹⁴² Dadurch sollen GFP-gekoppelte PFCs spezifisch an CIR-exprimierende Zellen dirigiert werden, woraufhin anschließend die Internalisierung erfolgt und diese Zellen so mittels ¹⁹F-MRT visualisiert werden können (Abb. 8.2).

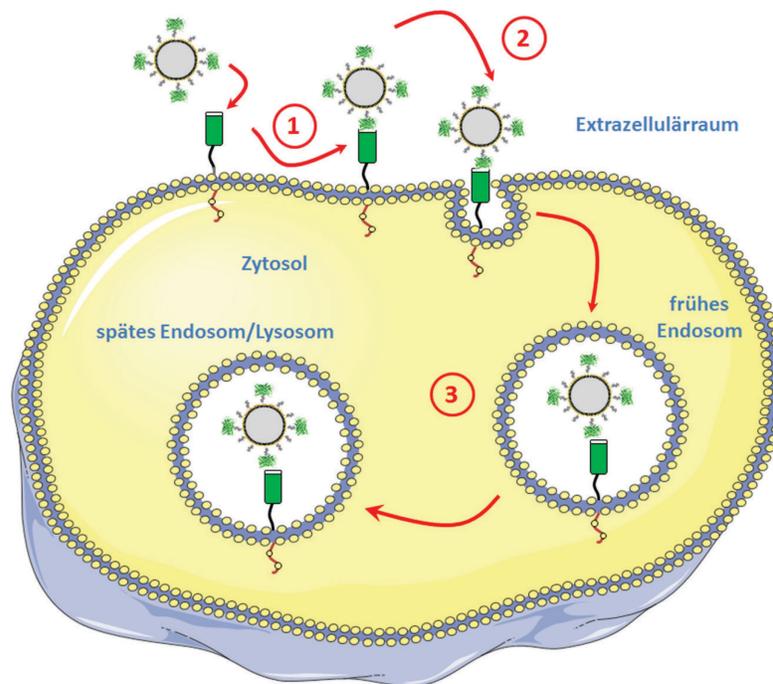


Abbildung 8.2: Hypothetische Funktion der CIR.

① CIR-exprimierende Zellen werden mit ^{GFP}PFCs inkubiert, woraufhin das GFP der Emulsion an den GFP-Nanobody des Rezeptors bindet. ② Durch die Bindung des GFP wird die Internalisierung des Rezeptors eingeleitet. ③ Die Aufnahme erfolgt vermutlich klassisch in endosomale/lysosomale Strukturen der Zelle. (Bilder modifiziert nach Servier Medical Art)

Nach zellulärer Transfektion mit CIR1-3 wurde zunächst der Einbau der CIRs sowie deren Funktion mittels Western Blot, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich nur in CIR⁺-Zellen eine spezifische Aufnahme des GFP, wohingegen in Kontrollzellen keinerlei Bindung und Internalisierung erfolgte. Da CIR1 nur eine CTD des IL-6 Rezeptors besitzt und dieser keine bekannten Internalisierungsmotive aufweist, wurde hier erwartungsgemäß nur ein geringes GFP-Signal detektiert.¹⁴⁴ Dabei handelt es sich vermutlich größtenteils um oberflächlich gebundenes GFP, da aufgrund des Fehlens spezifischer Internalisierungsmotive die Aufnahme erheblich

ineffizienter verläuft als bei CIR2 oder CIR3. Demgegenüber ist CIR2 mit der CTD des Mannose-Rezeptors Endo180 ausgestattet und verfügt damit sowohl über ein dihydrophobisches als auch ein FEGARY-Internalisierungsmotiv. Die Internalisierung des Endo180 erfolgt innerhalb weniger Minuten in Abhängigkeit von Kollagen.¹⁴³ In Abwesenheit von Kollagen findet ein ständiges Recycling des Endo180 zwischen Plasmamembran und endosomalen Strukturen statt.²³⁸ Sobald Kollagen gebunden hat, wird dieses Recycling unterbunden und es findet eine Verschmelzung mit lysosomalen Strukturen statt.²³⁹ Da das GFP vorwiegend in endosomalen Strukturen detektiert wurde, ist denkbar, dass das Recycling zur Plasmamembran auch durch die Bindung von GFP unterbunden und dann ebenso eine Verschmelzung mit lysosomalen Strukturen eingeleitet wird. Dies deckt sich auch mit dem Befund, dass GFP in den Immunfluoreszenz-Mikroskopiebildern oftmals in vesikulären Strukturen in der Nähe des Zellkerns gefunden wurde. Im Unterschied dazu weist der CIR3 die CTD des FC γ RIIa-Rezeptors auf. Durch die hierin enthaltenen ITAMs kommt es bei diesem zu einer phagozytotischen Aufnahme des Rezeptors samt GFP und darauf folgend zur Phagolysosomenbildung.^{145,240} Bemerkenswerterweise sind mit dem FC γ RIIa-Rezeptor transfizierte Zellen sogar in der Lage Erythrozyten zu phagozytieren.²⁴¹ Aufgrund dieser ausgeprägten Phagozytoseeigenschaften ist wahrscheinlich beim CIR3 auch initial das stärkste GFP-Signal auszumachen.

Für die Visualisierung der CIR⁺-Zellen mittels ¹⁹F-MRT wurde das GFP dann mit der PFC-Cargo gekoppelt. Mit den hergestellten ^{GFP}PFCs konnten sowohl transiente, als auch stabil transfizierte CIR1-3⁺-Zellen visualisiert werden können. Gerade die Detektion der transient transfizierten Zellen ist ein kritischer Punkt, da hier – ähnlich wie bei einer späteren *in vivo* Anwendung – nur ein geringer Anteil an Zellen die Rezeptoren exprimieren. Allerdings demonstrierten die *in vitro* Versuche, dass selbst in einer Mischpopulation mit ca. 10 % transfizierten Zellen eine erfolgreiche Darstellung mit ¹⁹F-MRT möglich ist. Interessanterweise wurde bei den stabil transfizierten Zellen für CIR2 die stärkste ^{GFP}PFC-Aufnahme beobachtet. Für CIR3 wurde zwar initial eine starke Bindung und Aufnahme detektiert, die aber dann nicht weiter zunahm. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass beim CIR3 das Recycling des Rezeptors zur Plasmamembran weniger effizient ausfällt. Demgegenüber verläuft die Internalisierung über CIR2 deutlich langsamer, aber dafür wird der Rezeptor anschließend wieder auf der Zelloberfläche präsentiert, so dass es zu einem stetigen Recycling zur Plasmamembran und erneuter Bindung sowie Aufnahme von ^{GFP}PFCs kommen kann. Die Idealform des Rezeptors wäre also eine Kombination aus CIR2+3: Ein Rezeptor mit phagozytotischen Eigenschaften, welcher nach jedem Internalisierungsvorgang schnell wieder zur Plasmamembran transportiert wird.

Um vor einer *in vivo* Anwendung zu überprüfen, inwieweit eine unspezifische Aufnahme der ^{GFP}PFCs durch phagozytierende Zelltypen, insbesondere den Blutmonozyten, erfolgt, wurde eine Ko-Kultur mit

murinen Immunzellen und CIR⁺-Zellen angesetzt und die Inkorporation der GFP⁺PFCs in die einzelnen Zellfraktionen untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass CIR⁺-Zellen die GFP⁺PFCs deutlich stärker aufnehmen als es murine Monozyten oder auch Granulozyten tun. Final konnte unter Verwendung des Matrigel/LPS-Modells gezeigt werden, dass auch eine Detektion von CIR⁺-Zellen in der Maus durch aktives Targeting über GFP⁺PFCs mittels ¹⁹F-MRT *in vivo* möglich ist.

Die Besonderheit des CIR-Systems ist, dass der Carrier unabhängig vom Liganden ist. Dementsprechend ist es ebenso möglich verschiedene Wachstumsfaktoren oder Medikamente über dieses System hochspezifisch in eine bestimmte Gruppe von Zellen einzuschleusen. Auch die unterschiedlichen CTDs sind variabel, einzig der extrazelluläre GFP-Nanobody wird benötigt. Insofern können unterschiedliche CTDs eingesetzt werden, je nachdem welcher Endozytosepfad oder welches intrazelluläre Ziel gerade gewünscht ist. Dies kann z. B. für polarisierte Zellen, wie Endothelzellen, ausgenutzt werden: Da hier nur die apikale Seite dem Blutstrom zugewandt ist, ist es wichtig, den Rezeptor in diese Richtung zu dirigieren. Hierfür wäre die CTD des IL-11R gut geeignet, die sowohl den Transport zur apikalen Seite initiiert als auch endozytotisch aufgenommen wird.²⁴² Eine weitere Verwendungsmöglichkeit dieses System wäre es, bestimmte Strukturen oder Zellen mit GFP zu markieren, um CIR⁺-Zellen an diese Ziele zu dirigieren.

Für die Zukunft ist geplant, eine transgene Maus zu generieren, welche ubiquitär den CIR2 exprimiert (Abb. 8.2). Durch Verpaarung dieser Maus mit spezifischen Cre-deleter Mäusen ließe sich der Rezeptor speziell auf einer gewünschten Zellpopulation exprimieren, um diese dann mittels GFP⁺PFCs hochspezifisch anzusteuern. Eine interessanter Kandidat hierfür wären T-Zellen, die ansonsten für Bildgebungszwecke schwierig zu markieren sind, da sie keine aktiven phagozytotischen Eigenschaften aufweisen. In der Literatur sind zwar bereits Ansätze für ein aktives T-Zell-Targeting beschrieben, jedoch sind diese weit von einer *in vivo* Anwendung entfernt und auch nicht für die Fluorbildgebung ausgelegt.²⁴³

Zusammengefasst konnte mit den CIRs ein artifizielles Rezeptorsystem etabliert werden, dass dazu geeignet ist, GFP⁺PFCs auch an Zellen ohne phagozytotische Eigenschaften zu dirigieren und diese hochspezifisch mittels ¹⁹F-MRT darzustellen. Unter Verwendung zelltypspezifischer CIR⁺-Mäuse stellt dieser Ansatz somit eine neue Bildgebungsplattform zur Visualisierung individueller Zellpopulationen dar.

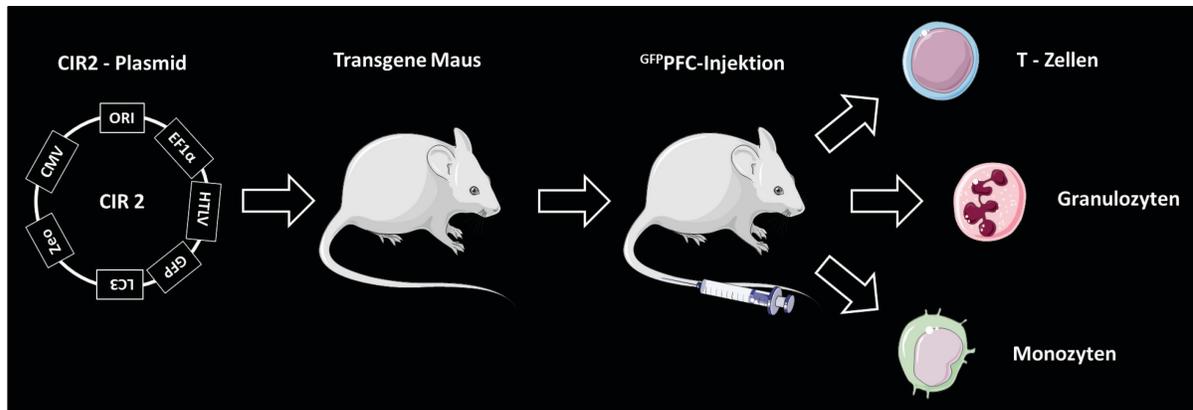


Abbildung 8.3: Strategie für ein zellspezifisches Targeting *in vivo*.

Der CIR2 soll in den Rosa Locus von Mäusen integriert werden, so dass dieser ubiquitär exprimiert wird. Durch Kreuzung mit bestimmten Cre-deleter Mäusen lässt sich so der Rezeptor auf einer spezifischen Zellpopulation exprimieren. Dadurch ließen sich diese Zellen hochspezifisch mittels ^{19}F MRT *in vivo* detektieren. (Bilder modifiziert nach Servier Medical Art)

8.3 Ausblick

Eine wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit ist, dass es sich für zukünftige *in vivo* Targetingstrategien anbietet, Emulsionen mit größeren Partikeln zu verwenden. Diese werden zum einen stärker von der Zielzelle aufgenommen, zum anderen lässt sich dadurch die unspezifische Akkumulation des Kontrastmittels im Entzündungsherd durch den EPR-Effekt minimieren. Somit kann durch Kombination der in Kapitel 8.2 beschriebenen aktiven Targetingansätze mit einem größerem Durchmesser der Partikel die Spezifität des *in vivo* Targeting sicherlich noch deutlich verbessert werden.

Die beiden vorgestellten Targetingansätze können auf sehr unterschiedliche Weise eingesetzt werden. Mit den CIRs liegt ein System vor, welches insbesondere für die Grundlagenforschung von großem Interesse ist. Durch Verwendung CIR⁺-Mausstämme kann der Rezeptor auf einer einzigen Zellpopulation exprimiert werden, was es ermöglicht, die Migration und den Anteil individueller Immunzellen in den unterschiedlichsten Krankheitsmodellen nicht-invasiv zu messen.

Bei dem Neutrophilentargeting liegt ein sehr translationaler Ansatz vor, der durch Kombination von NG2 mit beliebigen Kontrastmitteln im klinischen Bereich auch für andere Bildgebungsmodalitäten genutzt werden könnte. Allerdings kommt der entsprechende Rezeptor (CD177) auch auf neutrophilen Granulozyten von Mäusen vor, was bei Identifikation eines geeigneten Peptids auch murine Studien mit diesem Targetingansatz erlauben würde. Es ist zwar bekannt, dass das murine CD177 eine 50%ige Homologie zum humanen aufweist, jedoch nicht, ob es auch vergleichbare Funktionen ausübt.

9. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit sollte ein aktives Targeting von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) zur Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht-invasiver ^{19}F -MRT etabliert werden. Die ^{19}F -MRT hat den Vorteil, das Fluor normalerweise nicht im Organismus vorkommt und somit als komplett hintergrundfreies Kontrastmittel dienen kann. Bisher finden PFCs für die passive Detektion von entzündlichen Prozessen Verwendung. Dazu werden PFCs intravenös in den Organismus injiziert, wo sie daraufhin von phagozytotisch aktiven Zellen, insbesondere den Blutmonozyten, aufgenommen werden. Im Falle einer Entzündung migrieren diese Zellen in den entzündeten Bereich und können so mittels ^{19}F -MRT visualisiert werden. Da hier keine spezifische Immuzellfraktion, sondern alle zur Phagozytose befähigten Zellen mit den PFCs beladen werden, handelt es sich um ein rein passives Targeting.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der PFCs für ein aktives Targeting optimiert. Hierzu wurden zum einen der Einfluss einer PEGylierung als auch der Größe von PFCs auf deren zelluläre Internalisierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich für ein aktives Targeting insbesondere große PFCs > 250 nm mit einem hohen PEG-Anteil eignen.

Darauf aufbauend wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Basis für das aktive Targeting von individuellen Zellpopulationen mittels Liganden-gekoppelter PFCs gelegt. Zum einen wurde ein Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten über ein spezifisches Peptid (NG2) etabliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid an eine Subpopulation (ca. 50%) von humanen neutrophilen Granulozyten bindet, die CD177 exprimiert und dieses im Zuge eines Myokardinfarktes hochreguliert. Durch Kopplung des NG2 an PFCs ($^{\text{NG2}}$ PFCs) war es schließlich möglich, diese Subpopulation von Granulozyten eindeutig mittels ^{19}F -MRT zu visualisieren.

Zum anderen wurde ein artifizielles Rezeptorsystem (CIR, Cargo-Internalisierungs-Rezeptor) etabliert, welches über einen GFP-Nanobody hochspezifisch GFP bindet. Durch Kopplung von GFP an PFCs ($^{\text{GFP}}$ PFCs) lassen sich dadurch CIR⁺-Zellen unverwechselbar mittels ^{19}F -MRT nachweisen, da nach Bindung des GFP an den Rezeptor, dieser samt $^{\text{GFP}}$ PFCs internalisiert wird und somit das Fluor in der Zelle akkumuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass selbst in einer Ko-Kultur aus CIR⁺-Zellen und Immunzellen, erstere eine vielfach höhere Affinität für die $^{\text{GFP}}$ PFCs aufweisen. Des Weiteren konnte final die *in vivo* Tauglichkeit dieses Ansatzes innerhalb eines milden Inflammationsmodells demonstriert werden.

10. Abstract

The present work aimed at establishing an active targeting of perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) for visualization of specific cell types by non-invasive ^{19}F MRI (magnetic resonance imaging). ^{19}F MRI has a sensitivity close to ^1H MRI, but offers the benefit that fluorine is nearly absent from biological tissue and thus, fluorine-containing compounds can serve as MRI contrast agents completely free of endogenous background signals. So far, PFCs have been exploited for detection of inflammatory processes taking advantage of the avid uptake of intravenously injected PFCs by phagocytic immune cells, in particular monocytes and macrophages. These PFC-loaded cells migrate into the inflamed area and, subsequently, can readily be detected by ^{19}F MRI. Importantly, the fluorine-based contrast agent does not interfere with anatomical ^1H images and merging of ^1H and ^{19}F data enables the precise localization of the inflammatory hot spot. Although monocytes and macrophages are the cell types which are predominantly loaded with PFCs, under certain circumstances other phagocytic cells can be labelled with PFCs.

The first part of this work focused on optimizing the physicochemical properties of PFCs for an active targeting. To this end, it was systematically investigated how PEGylation and size of PFCs impact on their cellular internalization and it was found that large PFCs (> 250 nm) with a high amount of PEGylation should be particularly suited for the specific targeting of individual cells.

In the second part, individual cell populations were targeted using ligand-coupled PFCs. On the one hand, a specific peptide (NG2) was utilized for directing PFCs to a subpopulation of human neutrophil granulocytes (approximately 50% of the entire population). The receptor for NG2 was identified by mass spectroscopy to be CD177. By coupling of NG2 to PFCs ($^{\text{NG2}}$ PFCs), it was possible to specifically label and visualize this neutrophil subpopulation by ^{19}F MRI. Interestingly, it was also found that binding of NG2 and labelling with $^{\text{NG2}}$ PFCs is strongly enhanced in neutrophils isolated from patients after myocardial infarction.

On the other hand, a cargo internalization receptor system (CIR) was established which is based on synthetic cell surface receptors composed of a GFP nanobody, parts of the IL6 receptor, and three different transmembrane/cytoplasmic domains that determine the endocytic properties of the respective CIR. All CIRs displayed a highly specific GFP binding and coupling GFP to PFCs ($^{\text{GFP}}$ PFCs) enabled the detection of CIR⁺ cells by ^{19}F MRI. The CIR/ $^{\text{GFP}}$ PFC complexes are rapidly internalized from the cell surface into the endosomal system which ensures trapping of the contrast cargo within the cell type of interest. Moreover, CIR⁺ cells were able to outcompete even phagocytic immune cells for $^{\text{GFP}}$ PFC binding, indicating that this system is suitable for the *in vivo* tracking of specific CIR⁺ cell types.

11. Literaturverzeichnis

1. Klinker, R. *Physiologie*. (Thieme, 2010).
2. Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **33**, 2551–2567 (2012).
3. Boateng, S. & Sanborn, T. Acute myocardial infarction. *Dis. Mon.* **59**, 83–96 (2013).
4. Welch, T. D., Yang, E. H., Reeder, G. S. & Gersh, B. J. Modern Management of Acute Myocardial Infarction. *Curr. Probl. Cardiol.* **37**, 237–310 (2012).
5. Lewis, E. F. *et al.* Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: The CARE study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1446–1453 (2003).
6. Velagaleti, R. S. *et al.* Long-Term Trends in the Incidence of Heart Failure After Myocardial Infarction. *Circulation* **118**, 2057–2062 (2008).
7. Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **81**, 474–481 (2009).
8. Kempf, T., Zarbock, A., Vestweber, D. & Wollert, K. C. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J. Mol. Med.* **90**, 361–369 (2012).
9. Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* **110**, 159–173 (2012).
10. Timmers, L. *et al.* The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* **94**, 276–283 (2012).
11. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
12. Haan, J. J., Smeets, M. B., Pasterkamp, G. & Arslan, F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* **2013**, 206039 (2013).
13. Arslan, F., Kleijn, D. P. & Pasterkamp, G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 292–300 (2011).
14. Selejan, S. *et al.* Ischaemia-induced up-regulation of Toll-like receptor 2 in circulating monocytes in cardiogenic shock. *Eur. Heart J.* **33**, 1085–1094 (2012).

15. van der Pouw Kraan, T. C. T. M. *et al.* Systemic toll-like receptor and interleukin-18 pathway activation in patients with acute ST elevation myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **67**, 94–102 (2014).
16. Satoh, M. *et al.* Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **109**, 226–234 (2006).
17. Methe, H. *et al.* Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* **111**, 2654–2661 (2005).
18. Ritchie, M. E. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* **98**, 1707–1713 (1998).
19. Ghigo, A., Franco, I., Morello, F. & Hirsch, E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc. Res.* **102**, 270–280 (2014).
20. Yamauchi-Takahara, K. *et al.* Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* **91**, 1520–1524 (1995).
21. Weyrich, A. S., Ma, X. Y., Lefer, D. J., Albertine, K. H. & Lefer, A. M. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **91**, 2620–2629 (1993).
22. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
23. Frangogiannis, N. G. *et al.* Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 1428–1430 (2001).
24. Kumar, A. G. *et al.* Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* **95**, 693–700 (1997).
25. Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **0**, 74–82 (2014).
26. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 24–35 (2013).

27. Dincey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A. & Finch, C. A. Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* **58**, 705–715 (1976).
28. Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K. & Link, D. C. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).
29. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 2731–2738 (2004).
30. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
31. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways☆. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).
32. Das, S. T. *et al.* Monomeric and Dimeric CXCL8 Are Both Essential for In Vivo Neutrophil Recruitment. *PLOS ONE* **5**, e11754 (2010).
33. Hammond, M. E. W. *et al.* IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J. Immunol.* **155**, 1428–1433 (1995).
34. Hall, D. A., Beresford, I. J. M., Browning, C. & Giles, H. Signalling by CXC-chemokine receptors 1 and 2 expressed in CHO cells: a comparison of calcium mobilization, inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of GTP γ S binding induced by IL-8 and GRO α . *Br. J. Pharmacol.* **126**, 810–818 (1999).
35. Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M. K., Vestweber, D. & Frenette, P. S. Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477–489 (2007).
36. Phillipson, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* **203**, 2569–2575 (2006).
37. Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* **92**, 3007–3017 (1998).
38. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
39. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* **8**, 668–676 (2006).

40. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
41. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
42. Dewald, O. *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889 (2005).
43. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
44. Serhan, C. N., Chiang, N. & van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
45. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531 (2011).
46. Horckmans, M. *et al.* Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur. Heart J.* (2016). doi:10.1093/eurheartj/ehw002
47. Kempf, T. *et al.* GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat. Med.* **17**, 581–588 (2011).
48. Matsukawa, A. *et al.* Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 3354–3359 (2005).
49. Dobaczewski, M., Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 600–606 (2011).
50. Ikeuchi, M. *et al.* Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc. Res.* **64**, 526–535 (2004).
51. Rainer, P. P. *et al.* Cardiomyocyte-specific transforming growth factor beta suppression blocks neutrophil infiltration, augments multiple cytoprotective cascades, and reduces early mortality after myocardial infarction. *Circ. Res.* **114**, 1246–1257 (2014).
52. Lorchner, H. *et al.* Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat. Med.* **21**, 353–362 (2015).

53. Hofmann, U. *et al.* Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **125**, 1652–1663 (2012).
54. Santiago, J.-J. *et al.* Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **239**, 1573–1584 (2010).
55. Yano, T. *et al.* Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* **14**, 241–246 (2005).
56. Mollmann, H. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.* **71**, 661–671 (2006).
57. Dobaczewski, M. *et al.* Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res.* **324**, 475–488 (2006).
58. Benn Reinhard & Günther Harald. Moderne Pulsfolgen in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie. *Angew. Chem.* **95**, 381–411 (2006).
59. Rücker, G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. (1988).
60. Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung.* (John Wiley & Sons, 2013).
61. Ahrens, E. T. & Bulte, J. W. M. Tracking immune cells *in vivo* using magnetic resonance imaging. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 755–763 (2013).
62. Tirotta, I. *et al.* 19F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chem. Rev.* **115**, 1106–1129 (2015).
63. Na Hyon Bin, Song In Chan & Hyeon Taeghwan. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Adv. Mater.* **21**, 2133–2148 (2009).
64. Nakamura, H., Ito, N., Kotake, F., Mizokami, Y. & Matsuoka, T. Tumor-detecting capacity and clinical usefulness of SPIO-MRI in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* **35**, 849–855 (2000).
65. Gulati, A. *et al.* Association of Fibrosis With Mortality and Sudden Cardiac Death in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *JAMA* **309**, 896–908 (2013).

66. Kim, R. J. *et al.* Relationship of MRI Delayed Contrast Enhancement to Irreversible Injury, Infarct Age, and Contractile Function. *Circulation* **100**, 1992–2002 (1999).
67. Vergauwen, E. *et al.* Central nervous system gadolinium accumulation in patients undergoing periodical contrast MRI screening for hereditary tumor syndromes. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **16**, 2 (2018).
68. Krafft, M. P. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 209–228 (2001).
69. O'Hagan, D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 308–319 (2008).
70. Paul, A. G., Jones, K. C. & Sweetman, A. J. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 386–392 (2009).
71. Steenland, K., Fletcher, T. & Savitz, D. A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ. Health Perspect.* **118**, 1100–1108 (2010).
72. Somanchi, S. S., Kennis, B. A., Gopalakrishnan, V., Lee, D. A. & Bankson, J. A. In Vivo (19)F-Magnetic Resonance Imaging of Adoptively Transferred NK Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1441**, 317–332 (2016).
73. Bouchlaka, M. N. *et al.* 19F-MRI for monitoring human NK cells in vivo. *Oncoimmunology* **5**, (2016).
74. Gonzales, C. *et al.* In-Vivo Detection and Tracking of T Cells in Various Organs in a Melanoma Tumor Model by 19F-Fluorine MRS/MRI. *PLoS ONE* **11**, (2016).
75. Clark, L. C. & Gollan, F. Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. *Science* **152**, 1755–1756 (1966).
76. Yu, Q., Liu, K., Su, L., Xia, X. & Xu, X. Perfluorocarbon Liquid: Its Application in Vitreoretinal Surgery and Related Ocular Inflammation. *BioMed Research International* (2014).
doi:10.1155/2014/250323
77. Díaz-López, R., Tsapis, N. & Fattal, E. Liquid Perfluorocarbons as Contrast Agents for Ultrasonography and ¹⁹F-MRI. *Pharm. Res.* **27**, 1 (2010).

78. Hirschl, R. B. *et al.* Prospective, Randomized, Controlled Pilot Study of Partial Liquid Ventilation in Adult Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 781–787 (2002).
79. Tao, Z. & Ghoroghchian, P. P. Microparticle, nanoparticle, and stem cell-based oxygen carriers as advanced blood substitutes. *Trends Biotechnol.* **32**, 466–473 (2014).
80. Flögel, U. *et al.* In Vivo Monitoring of Inflammation After Cardiac and Cerebral Ischemia by Fluorine Magnetic Resonance Imaging. *Circulation* **118**, 140–148 (2008).
81. Ebner, B. *et al.* Early Assessment of Pulmonary Inflammation by ¹⁹F MRI In Vivo. CLINICAL PERSPECTIVE. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **3**, 202–210 (2010).
82. Flögel, U. *et al.* Noninvasive detection of graft rejection by in vivo (¹⁹F) MRI in the early stage. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 235–244 (2011).
83. Temme, S., Bönner, F., Schrader, J. & Flögel, U. ¹⁹F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 329–343 (2012).
84. Jacoby, C. *et al.* Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by (¹⁹F) MRI in vivo. *Magma N. Y. N* **27**, 101–106 (2014).
85. Bönner, F. *et al.* Multifunctional MR monitoring of the healing process after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **109**, 430 (2014).
86. Temme, S. *et al.* Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation* **131**, 1405–1414 (2015).
87. BANGHAM, A. D. & HORNE, R. W. NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. *J. Mol. Biol.* **8**, 660–668 (1964).
88. Gregoriadis, G. Medical applications of liposome-entrapped enzymes. *Methods Enzymol.* **44**, 698–709 (1976).
89. Gregoriadis, G. Liposome-entrapped proteins in therapeutic and preventive medicine. *Hindustan Antibiot. Bull.* **20**, 14–22 (1977).
90. BANGHAM, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. & Weissmann, G. The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. *Protoplasma* **63**, 183–187 (1967).

91. Hippalgaonkar, K., Majumdar, S. & Kansara, V. Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech* **11**, 1526–1540 (2010).
92. Mäder K. & Weidenauer U. *Innovative Arzneiformen*. (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2010).
93. Bauer, K. H., Frömming, K.-H. & Führer, C. *Pharmazeutische Technologie*. (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2012).
94. Bertilla, S. M., Thomas, J.-L., Marie, P. & Krafft, M. P. Cosurfactant effect of a semifluorinated alkane at a fluorocarbon/water interface: impact on the stabilization of fluorocarbon-in-water emulsions. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **20**, 3920–3924 (2004).
95. Mayenfels F. Fluorcarbonhaltige Nanoemulsionen zur Anwendung in der 1H/19F-Magnetresonanztomographie. (Albert-Ludwigs Universität).
96. Taylor, P. Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. *Adv. Colloid Interface Sci.* **106**, 261–285 (2003).
97. Cohn, S. M. Oxygen Therapeutics in Trauma and Surgery. *J. Trauma Acute Care Surg.* **54**, S193 (2003).
98. Lee, J. H., Park, J. W. & Lee, H. B. Cell adhesion and growth on polymer surfaces with hydroxyl groups prepared by water vapour plasma treatment. *Biomaterials* **12**, 443–448 (1991).
99. Peracchia, M. T., Vauthier, C., Passirani, C., Couvreur, P. & Labarre, D. Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sci.* **61**, 749–761 (1997).
100. Leroux, J. C., Jaeghere, F., Anner, B., Doelker, E. & Gurny, R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci.* **57**, 695–703 (1995).
101. Gref, R. *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **263**, 1600–1603 (1994).
102. Georgiev, G. A., Sarker, D. K., Al-Hanbali, O., Georgiev, G. D. & Lalchev, Z. Effects of poly(ethylene glycol) chains conformational transition on the properties of mixed DMPC/DMPE-PEG thin liquid films and monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **59**, 184–193 (2007).

103. Hak, S. *et al.* The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging. *ACS Nano* **6**, 5648–5658 (2012).
104. Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H. & Morel, P. A. *In vivo* imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 983–987 (2005).
105. Srinivas Mangala *et al.* In vivo cytometry of antigen-specific t cells using 19F MRI. *Magn. Reson. Med.* **62**, 747–753 (2009).
106. Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model - Srinivas - 2007 - Magnetic Resonance in Medicine - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.21352>. (Accessed: 20th March 2018)
107. Kadayakkara, D. K. *et al.* Inflammation Driven by Overexpression of the Hypoglycosylated Abnormal MUC1 Links Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Pancreatitis. *Pancreas* **39**, 510 (2010).
108. Helfer, B. M. *et al.* Functional assessment of human dendritic cells labeled for in vivo 19F magnetic resonance imaging cell tracking. *Cytotherapy* **12**, 238–250 (2010).
109. Moore Anna *et al.* MRI of insulinitis in autoimmune diabetes. *Magn. Reson. Med.* **47**, 751–758 (2002).
110. Anderson Stasia A. *et al.* Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **55**, 654–659 (2004).
111. Baumjohann Dirk *et al.* In vivo magnetic resonance imaging of dendritic cell migration into the draining lymph nodes of mice. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2544–2555 (2006).
112. Rohani, R. *et al.* In Vivo Cellular MRI of Dendritic Cell Migration Using Micrometer-Sized Iron Oxide (MPIO) Particles. *Mol. Imaging Biol.* **13**, 679–694 (2011).
113. Long, C. M., Laarhoven, H. W. M. van, Bulte, J. W. M. & Levitsky, H. I. Magnetovaccination as a Novel Method to Assess and Quantify Dendritic Cell Tumor Antigen Capture and Delivery to Lymph Nodes. *Cancer Res.* **69**, 3180–3187 (2009).
114. Frank, J. A. *et al.* Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents. *Radiology* **228**, 480–487 (2003).

115. Arbab Ali S. *et al.* Labeling of cells with ferumoxides–protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed.* **18**, 553–559 (2005).
116. Thu, M. S. *et al.* Self-assembling nanocomplexes by combining ferumoxytol, heparin and protamine for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* **18**, 463–467 (2012).
117. Ahrens E.T., Feili-Hariri M., Xu H., Genove G. & Morel P.A. Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging. *Magn. Reson. Med.* **49**, 1006–1013 (2003).
118. Kircher, M. F. *et al.* In Vivo High Resolution Three-Dimensional Imaging of Antigen-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Trafficking to Tumors. *Cancer Res.* **63**, 6838–6846 (2003).
119. Daldrup-Link, H. E. *et al.* In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging. *Eur. Radiol.* **15**, 4–13 (2005).
120. Bazak, R., Houri, M., Achy, S. E., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 769–784 (2015).
121. Franc Grégory & Kakkar Ashok K. Diels–Alder “Click” Chemistry in Designing Dendritic Macromolecules. *Chem. – Eur. J.* **15**, 5630–5639 (2009).
122. Targeted nanoparticles for the non-invasive detection of traumatic brain injury by optical imaging and fluorine magnetic resonance imaging | SpringerLink. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12274-016-1023-z>. (Accessed: 22nd March 2018)
123. Gantert, M. *et al.* Receptor-Specific Targeting with Liposomes In Vitro Based on Sterol-PEG1300 Anchors. *Pharm. Res.* **26**, 529 (2009).
124. Peracchia, M. T. *et al.* Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **60**, 121–128 (1999).
125. Klivanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **268**, 235–237 (1990).

126. Mori, A., Klibanov, A. L., Torchilin, V. P. & Huang, L. Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett.* **284**, 263–266 (1991).
127. Torchilin, V. P., Narula, J., Halpern, E. & Khaw, B. A. Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**, 75–83 (1996).
128. Frank, M. M. & Fries, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* **12**, 322–326 (1991).
129. Alberts, B. *Alberts - Molecular Biology of the Cell.* (Garland Science).
130. Grapentin C., M. F., Barnert S. .. Süß R. .. Schubert R. .. Temme S. .. Jacoby C. .. Schrader J. .. Flögel U. Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by ¹⁹F MRI. *Nanomedicine One Cent. Press* 268–286 (2014).
131. Temme, S. *et al.* Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive ¹⁹F MRI. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 689–697 (2014).
132. Azab, B. *et al.* Usefulness of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Predicting Short- and Long-Term Mortality After Non–ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* **106**, 470–476 (2010).
133. Núñez, J. *et al.* Usefulness of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Predicting Long-Term Mortality in ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* **101**, 747–752 (2008).
134. Mazzucchelli, L. *et al.* Cell-specific peptide binding by human neutrophils. *Blood* **93**, 1738–1748 (1999).
135. Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C. & Wagner, E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.* **269**, 12918–12924 (1994).
136. Roederer, M., Bowser, R. & Murphy, R. F. Kinetics and temperature dependence of exposure of endocytosed material to proteolytic enzymes and low pH: Evidence for a maturation model for the formation of lysosomes. *J. Cell. Physiol.* **131**, 200–209 (1987).

137. Murphy, R. F. Analysis and isolation of endocytic vesicles by flow cytometry and sorting: demonstration of three kinetically distinct compartments involved in fluid-phase endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 8523–8526 (1985).
138. Geisow, M. J. & Evans, W. H. pH in the endosome. *Exp. Cell Res.* **150**, 36–46 (1984).
139. FITC-dextran as a probe for endosome function and localization in kidney | American Journal of Physiology-Cell Physiology. Available at: <https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.1990.258.2.C309>. (Accessed: 10th March 2018)
140. Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F. & Weiss, S. J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**, 99–102 (1991).
141. Cole, A. T. *et al.* Mucosal factors inducing neutrophil movement in ulcerative colitis: the role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Gut* **39**, 248–254 (1996).
142. Rothbauer, U. *et al.* A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 282–289 (2008).
143. Isacke, C. M., Geer, P. van der, Hunter, T. & Trowbridge, I. S. p180, a novel recycling transmembrane glycoprotein with restricted cell type expression. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2606–2618 (1990).
144. Dittrich, E. *et al.* Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 19014–19020 (1994).
145. Indik, Z. K., Park, J. G., Hunter, S. & Schreiber, A. D. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* **86**, 4389–4399 (1995).
146. Indik, Z. K. *et al.* Insertion of cytoplasmic tyrosine sequences into the nonphagocytic receptor Fc gamma RIIB establishes phagocytic function. *Blood* **83**, 2072–2080 (1994).
147. Santos, L. E. & Ferreira, S. T. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology* (2017).
doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.016
148. Frasca, D., Blomberg, B. B. & Paganelli, R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

149. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
150. Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B. & Schwarz, M. J. The role of inflammation in schizophrenia. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
151. Anzai, A. *et al.* Regulatory Role of Dendritic Cells in Postinfarction Healing and Left Ventricular Remodeling. *Circulation* (2012).
152. Leuschner, F. *et al.* Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **209**, 123–137 (2012).
153. Nahrendorf, M., Pittet, M. J. & Swirski, F. K. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation* (2010).
154. Bahmani, B., Vohra, I., Kamaly, N. & Abdi, R. Active targeted delivery of immune therapeutics to lymph nodes. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **23**, 8 (2018).
155. Flögel, U. *et al.* Multimodal assessment of orbital immune cell infiltration and tissue remodeling during development of graves disease by 1H19F MRI. *Magn. Reson. Med.* (2018).
doi:10.1002/mrm.27064
156. Ding Zhaoping *et al.* Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. *STEM CELLS Transl. Med.* **5**, 639–650 (2016).
157. Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **268**, 235–237 (1990).
158. Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. & Yau-Young, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1066**, 29–36 (1991).
159. Blume, G. *et al.* Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1149**, 180–184 (1993).
160. Hsu, M. J. & Juliano, R. L. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system: II. Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **720**, 411–419 (1982).

161. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. & Paknikar, K. M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 310–318 (2009).
162. Riess, J. G. Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to In Vivo Oxygen Delivery. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **33**, 47–63 (2005).
163. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. & Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 3657–3666 (2010).
164. Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C. & Gregoriadis, G. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: Studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1062**, 77–82 (1991).
165. Huey, R. & Hugli, T. E. Characterization of a C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes (PMN). *J. Immunol.* **135**, 2063–2068 (1985).
166. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
167. Monopoli, M. P. *et al.* Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2525–2534 (2011).
168. Vertut-Doi, A., Ishiwata, H. & Miyajima, K. Binding and uptake of liposomes containing a poly(ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: influence of PEG content and its molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1278**, 19–28 (1996).
169. Tromsdorf, U. I., Bruns, O. T., Salmen, S. C., Beisiegel, U. & Weller, H. A Highly Effective, Nontoxic T1 MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **9**, 4434–4440 (2009).
170. Lesniak, A. *et al.* Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* **31**, 9511–9518 (2010).
171. Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K. & Franzen, S. Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir* **21**, 9303–9307 (2005).
172. Hak, S., Garaiova, Z., Olsen, L. T., Nilsen, A. M. & Lange Davies, C. The effects of oil-in-water nanoemulsion polyethylene glycol surface density on intracellular stability, pharmacokinetics, and biodistribution in tumor bearing mice. *Pharm. Res.* **32**, 1475–1485 (2015).

173. Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* **5**, 85–87 (1995).
174. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release* **145**, 182–195 (2010).
175. Williams, T. M. & Lisanti, M. P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C494–506 (2005).
176. Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 424–431 (1999).
177. Lisanti, M. P. *et al.* Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol. Membr. Biol.* **12**, 121–124 (1995).
178. Falcone, S. *et al.* Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci* **119**, 4758–4769 (2006).
179. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510–520 (2009).
180. Kolb-Mäurer, A., Wilhelm, M., Weissinger, F., Bröcker, E.-B. & Goebel, W. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Blood* **100**, 3703–3709 (2002).
181. Fiorentini, C. *et al.* Activation of Rho GTPases by Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Induces Macropinocytosis and Scavenging Activity in Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2061–2073 (2001).
182. Crommelin, D. J. A. & Bommel, E. M. G. van. Stability of Liposomes on Storage: Freeze Dried, Frozen or as an Aqueous Dispersion. *Pharm. Res.* **1**, 159–163 (1984).
183. Szoka, Jr & Papahadjopoulos, and D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467–508 (1980).
184. Guyer, W. & Bloch, K. Phosphatidylcholine and cholesterol interactions in model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **33**, 313–322 (1983).
185. Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S. & Altschuler, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 26–32 (2007).
186. Vasir, J. K. & Labhasetwar, V. Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* **29**, 4244–4252 (2008).

187. Pratten, M. K. & Lloyd, J. B. Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **881**, 307–313 (1986).
188. Chono, S., Tauchi, Y. & Morimoto, K. Influence of Particle Size on the Distributions of Liposomes to Atherosclerotic Lesions in Mice. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **32**, 125–135 (2006).
189. Chono, S., Tanino, T., Seki, T. & Morimoto, K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J. Drug Target.* **14**, 557–566 (2006).
190. Harashima, H., Sakata, K., Funato, K. & Kiwada, H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharm. Res.* **11**, 402–406 (1994).
191. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**, 1107–1117 (1993).
192. Potassium-dependent assembly of coated pits: new coated pits form as planar clathrin lattices. *J. Cell Biol.* **103**, 2619–2627 (1986).
193. Regulated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* **127**, 1199–1215 (1994).
194. Nabi, I. R. & Le, P. U. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* **161**, 673–677 (2003).
195. Vercauteren, D. *et al.* The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol. Ther.* **18**, 561–569 (2010).
196. Ingham, K. C. & Ling, R. C. A quantitative assay for poly(ethylene glycol) without interference by proteins. *Anal. Biochem.* **85**, 139–145 (1978).
197. Jia, Z. & Tian, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. *Desalination* **247**, 423–429 (2009).
198. Chung, T.-W., Chung, C.-H. & Lue, Y.-F. A Colorimetric Method for Determining Distearoylphosphatidylethanolamine– Polyethylene Glycol 2000 in Blood Suspension. *Anal. Biochem.* **285**, 264–267 (2000).

199. Moghimi, S. M., Hedeman, H., Muir, I. S., Illum, L. & Davis, S. S. An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1157**, 233–240 (1993).
200. Panagi, Z. *et al.* Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA–mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **221**, 143–152 (2001).
201. Gref, R. *et al.* The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 316–326 (2012).
202. Illum, L., Davis, S. S., Müller, R. H., Mak, E. & West, P. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer - poloxamine 908. *Life Sci.* **40**, 367–374 (1987).
203. Porter, C. J., Moghimi, S. M., Illum, L. & Davis, S. S. The polyoxyethylene/polyoxypropylene block co-polymer poloxamer-407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow. *FEBS Lett.* **305**, 62–66 (1992).
204. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
205. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207 (2001).
206. Seymour, L. W. *et al.* Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *Eur. J. Cancer* **31**, 766–770 (1995).
207. Larsen, E. K. U. *et al.* Size-Dependent Accumulation of PEGylated Silane-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Murine Tumors. *ACS Nano* **3**, 1947–1951 (2009).
208. van der Linden, R. H. J. *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1431**, 37–46 (1999).
209. Chakravarty, R., Goel, S. & Cai, W. Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging? *Theranostics* **4**, 386–398 (2014).
210. Revets, H., Baetselier, P. D. & Muyldermans, S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**, 111–124 (2005).

211. Wörn, A. & Plückthun, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. Edited by P. Wright. *J. Mol. Biol.* **305**, 989–1010 (2001).
212. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. a. R. G. & Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng. Des. Sel.* **7**, 1129–1135 (1994).
213. Dumoulin, M. *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* **11**, 500–515 (2002).
214. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 2–25 (2014).
215. Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* **124**, 373–380 (1994).
216. Loftus, J. C., Smith, J. W. & Ginsberg, M. H. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J. Biol. Chem.* **269**, 25235–25238 (1994).
217. Jerke, U. *et al.* Complement Receptor Mac-1 Is an Adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA Neutrophil Activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 7070–7081 (2011).
218. Vietinghoff, S. von *et al.* NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* **109**, 4487–4493 (2007).
219. Sachs, U. J. H. *et al.* The Neutrophil-specific Antigen CD177 Is a Counter-receptor for Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31). *J. Biol. Chem.* **282**, 23603–23612 (2007).
220. Pliyev, B. K. & Menshikov, M. Comparative evaluation of the role of the adhesion molecule CD177 in neutrophil interactions with platelets and endothelium. *Eur. J. Haematol.* **89**, 236–244
221. Kuckleburg, C. J., Tilkens, S. B., Santoso, S. & Newman, P. J. Proteinase 3 Contributes to Transendothelial Migration of NB1-Positive Neutrophils. *J. Immunol.* **188**, 2419–2426 (2012).
222. Halbwegs-Mecarelli, L., Bessou, G., Lesavre, P., Lopez, S. & Witko-Sarsat, V. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett.* **374**, 29–33

223. Wang, L. *et al.* Surface receptor CD177/NB1 does not confer a recruitment advantage to neutrophilic granulocytes during human peritonitis. *Eur. J. Haematol.* **90**, 436–437
224. Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell* **147**, 868–880 (2011).
225. Rivest, S. *et al.* How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **223**, 22–38 (2000).
226. Tsai, R. K. & Discher, D. E. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J. Cell Biol.* **180**, 989–1003 (2008).
227. Rose, J. J., Foley, J. F., Murphy, P. M. & Venkatesan, S. On the Mechanism and Significance of Ligand-induced Internalization of Human Neutrophil Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2. *J. Biol. Chem.* **279**, 24372–24386 (2004).
228. Sheppard Forest R. *et al.* Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1025–1042 (2005).
229. Wright, H. L., Thomas, H. B., Moots, R. J. & Edwards, S. W. RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways following Neutrophil Priming. *PLOS ONE* **8**, e58598 (2013).
230. El-Benna, J., Dang, P. M.-C. & Gougerot-Pocidallo, M.-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.* **30**, 279–289 (2008).
231. Condliffe, A. M., Kitchen, E. & Chilvers, E. R. Neutrophil Priming: Pathophysiological Consequences and Underlying Mechanisms. *Clin. Sci.* **94**, 461–471 (1998).
232. Weisbart, R. H., Golde, D. W. & Gasson, J. C. Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J. Immunol.* **137**, 3584–3587 (1986).
233. Kuhns, D. B., Wright, D. G., Nath, J., Kaplan, S. S. & Basford, R. E. ATP induces transient elevations of [Ca²⁺]_i in human neutrophils and primes these cells for enhanced O₂⁻ generation. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **58**, 448–453 (1988).

234. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Burlak, C. & DeLeo, F. R. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp* **13** (2005).
235. Tennenberg Steven D., Fey Debra E. & Lieser Mark J. Oxidative priming of neutrophils by interferon- γ . *J. Leukoc. Biol.* **53**, 301–308 (1993).
236. Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M. & Johnston, R. B. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J. Exp. Med.* **160**, 1656–1671 (1984).
237. Shen Li *et al.* Differential regulation of neutrophil chemotaxis to IL-8 and fMLP by GM-CSF: lack of direct effect of oestradiol. *Immunology* **117**, 205–212 (2005).
238. Howard, M. J. & Isacke, C. M. The C-type Lectin Receptor Endo180 Displays Internalization and Recycling Properties Distinct from Other Members of the Mannose Receptor Family. *J. Biol. Chem.* **277**, 32320–32331 (2002).
239. Kjølner, L. *et al.* uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV. *Exp. Cell Res.* **293**, 106–116 (2004).
240. Worth, R. G. *et al.* The cytoplasmic domain of Fc γ RIIA (CD32) participates in phagolysosome formation. *Blood* **98**, 3429–3434 (2001).
241. Tuijnman, W. B., Capel, P. J. & Winkel, J. van de. Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood* **79**, 1651–1656 (1992).
242. Monhasery, N. *et al.* Transcytosis of IL-11 and Apical Redirection of gp130 Is Mediated by IL-11 α Receptor. *Cell Rep.* **16**, 1067–1081 (2016).
243. Dinauer, N. *et al.* Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials* **26**, 5898–5906 (2005).

12. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Schrader dafür, dass ich die Gerätschaften und Labore der molekularen Kardiologie für die Anfertigung meiner Arbeit nutzen durfte.

Ein großer Dank geht an Uli, der mir vor knapp vier Jahren überhaupt erst die Chance gab hier zu promovieren.

Dann danke ich natürlich allen (auch ehemaligen) MKs, die da wären Aseel, Bodo, Christina, Christoph, Julia, Julia, Mona, Sebastian, Sebastian, Tamara, Tuba, Uli, Vera, Wiebke und Zhaoping.

Zudem danke ich Herrn Prof. Scheller für die gute Kooperation innerhalb des SFB-Projekts. Dabei geht nochmal ein besonderer Dank an Erika, Paul und Jens, die vermutlich froh sind, dass ich nicht mehr grammweise GFP verballer.^^

Nicht unerwähnt bleiben natürlich unsere Pharmazeuten in Form von Christoph und Wolfgang. Wenn es mal nicht so funktionierte mit der eigenen Produktion, auf eure Emulsionen konnte man sich stets verlassen :) Und auch die „Fachtreffen“ zum „Austauschen“ werden in guter Erinnerung bleiben.

Dann muss natürlich noch die Kaffeeklatschtruppe erwähnt werden, welche die Inkubationszeiten deutlich erträglicher machte und bis zum äußersten streckte^^ Also nochmal ein besonderer Dank an Christoph, Julia, Mona, Tamara, Vera und Wiebke.

Inbesondere erwähnen möchte ich noch Christoph, als einzigen männlichen Mitleidenden. Ich werde unsere Pausen auf jeden Fall sehr missen : (

Ebenfalls ein besonderer Dank geht an Tamara für die gemeinsame Bürozeit und deine Last-Minute Korrektur. Erstaunlich, wie viele Fehler ich kontinuierlich überlesen konnte^^

Ein weiterer, besonderer Dank geht an Vera, die mir gerade im Bereich des Neutrophilentargeting sehr viel Arbeit abgenommen hat. Ich habe die Zusammenarbeit auf jeden Fall sehr genossen :)

Noch einmal hervorheben aus der Schar der MKler möchte ich Sebastian. Ohne dich würde ich vermutlich in vier Jahren noch nicht promovieren. Gerade in der ersten Zeit hast du mir die

entscheidenden Dinge beigebracht, warst bei Fragen immer zur Stelle und hast dir immer die Zeit dafür genommen. Vielen, vielen Dank !

Des Weiteren danke ich meiner Familie für die Unterstützung während der gesamten Zeit und auch der Zeit davor. Mittlerweile zieht sich das Studium ja fast schon über 10 Jahre... O_O

Meiner Schwester danke ich nochmal besonders für das akribische Korrekturlesen und die investierte Zeit.

Zum Schluss möchte ich noch Anika für ihre Unterstützung und Geduld danken.

Bild

13. Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Ort, Datum)

(Unterschrift, Pascal Bouvain)

14. Publikationsliste

14.1 Veröffentlichungen

A synthetic “Cargo Internalization Receptor (CIR)” System for nanoparticle Tracking of Individual Cell populations by ^{19}F MRI – Sebastian Temme[#], Paul Baran[#], Pascal Bouvain[#], Christoph Grapentin, Wolfgang Krämer, Birgit Knebel, Hadi Al-Hasani, Jens Moll, Doreen Floss, Jürgen Schrader, Rolf Schubert, Ulrich Flögel* and Jürgen Scheller* – in Revision bei ACS Nano
[#]Gleichberechtigte Autoren

Dissociation of ^{19}F and fluorescence signal upon cellular uptake of dual contrast perfluorocarbon nanoemulsions – Pascal Bouvain, Vera Flocke, Wolfgang Krämer, Rolf Schubert, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel*, and Sebastian Temme* - in Revision bei MAGMA special issue

Active targeting of human neutrophil granulocytes from patients after AMI by non invasive ^{19}F MRI - Pascal Bouvain, Vera Flocke, Wolfgang Krämer, Rolf Schubert, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel*, and Sebastian Temme* – Manuskript in Vorbereitung

IL-23R Signaling play no role in myocardial infarction – Erika Engelowski, Nastaran Fazel Modares, Simone Gorressen, Pascal Bouvain, Dominik Semmler, Christina Alter, Zhaoping Ding, Ulrich Flögel, Haifeng Xu, Philipp A. Lang, Jens Fischer, Doreen M. Floss, Jürgen Scheller – in Revision bei Scientific Reports

14.2 Kongressbeiträge

European Molecular Imaging Meeting – EMIM, Utrecht, Niederlande, 2016 – Vortrag: Specific Cell Targeting for MR Using a Unique “Cargo Internalization Receptor” System

International Society for Magnetic Resonance in Medicine – ISMRM, Hawaii, USA, 2017 – Power Pitch Vortrag: A Unique “Cargo Internalization Receptor (CIR)” System for In Vivo Tracking of Individual Cell populations by ^{19}F MRI

Red Hot MRI – Fluorine Imaging in Berlin, Deutschland, 2017 – Power Pitch Vortrag: Active Targeting of human neutrophil granulocytes by non-invasive ^{19}F MRI

International Society for Magnetic Resonance in Medicine – ISMRM, Paris, Frankreich, 2018 –
Vortrag: Active Targeting of human neutrophil granulocytes by non-invasive ^{19}F MRI

Europhysiology 2018 – London, Großbritannien, 2018 – Poster: Active targeting of a human
neutrophil subpopulation by non-invasive ^{19}F MRI