

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Prof. Dr. Jürgen Schrader

**Darstellung von Entzündungsprozessen mittels
nichtinvasiver ^{19}F -Magnetresonanztomographie**

Habilitationsschrift
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Düsseldorf

2019

Für Henri, Paul und Nadine

5122 - 38°43'16.4"N 9°28'43.7"W

INHALT

I Einleitung.....	1
I.1. Entzündungsprozesse.....	1
Einwanderung von Immunzellen.....	1
Resolution, Proliferation und Gewebeumbau.....	2
I.2. Darstellung von Entzündungsprozessen über bildgebende Verfahren.....	3
Visualisierung von Entzündungsprozessen mittels Magnetresonanztomographie	5
Inflammationsbildgebung über ^1H -/ ^{19}F -Magnetresonanztomographie.....	6
I.3. Zielsetzung der Arbeit	9
1. ^{19}F -MRT-vermittelte Visualisierung von Zellen mit endozytischen Eigenschaften	9
2. Aktives Targeting von PFCs.....	9
3. ^{19}F -MRT von PFCs mit komplexer spektraler Signatur	9
II Ergebnisse und Diskussion	10
II.1 ^{19}F -MRT von Zellen mit endozytischen Eigenschaften	10
II.1.1 ^{19}F -MRT von Neutrophilen und Monozyten im Verlaufe eines Entzündungsprozesses	11
II.1.2 Tracking von epikardialen mesenchymalen Progenitorzellen (EPDCs)	14
II.1.3 Dissoziation von ^{19}F - und Fluoreszenzsignal nach zellulärer Aufnahme von PFCs	16
II.2 Aktives Targeting von PFCs.....	21
II.2.1 Darstellung von venösen Thromben mittels aktivem Targeting und ^1H -/ ^{19}F -MRT	21
II.2.2 Aktives Targeting von Zellen durch ein synthetisches Cargo-Internalisierungssystems.....	25
II.3 Darstellung von PFCs mit komplexen ^{19}F -Spektren.....	30
II.3.1 ^{19}F -MRT durch Chemical Shift Imaging (CSI).....	31
II.3.2 Narrow Bandwidth Imaging (NBI)	33
II.4 Zusammenfassung.....	35
III Ausblick.....	36
IV Anhang	38
IV.1 Literaturverzeichnis.....	38
IV.2 Danksagung	44
IV.3 Ausgewählte Originalarbeiten.....	45
IV.4 Erklärung	46

I EINLEITUNG

I.1. Entzündungsprozesse

Entzündungen sind Reaktionen des Körpers auf schädigende Reize und darauf ausgelegt, diese zu eliminieren, entstandene Schäden zu reparieren und die Integrität des Gewebes wiederherzustellen. Entzündungsprozesse können durch physikalische Reize (extreme Temperaturen, Elektrizität, Strahlung, mechanische Verletzungen), chemische Substanzen (Stoffwechselprodukte, Säuren, Laugen, Medikamente, Toxine) oder durch biologische Auslöser (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten, Immunzellen oder Immunkomplexe) verursacht werden. Medizinisch sind Entzündungsprozesse auch deshalb bedeutsam, da sie an der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt sind und auch deren Verlauf entscheidend beeinflussen können. Dazu gehören der Herzinfarkt¹, Alzheimer², Typ-2-Diabetes^{3,4}, Fettleibigkeit^{3,4}, Krebserkrankungen⁵, Bluthochdruck⁶, aber auch Atherosklerose⁷ und Autoimmunerkrankungen. Die Initiierung und auch der Verlauf der jeweiligen Entzündungsreaktion wird dabei entscheidend durch lokale und aus dem Blut eingewanderte Immunzellen bestimmt.

Einwanderung von Immunzellen

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die innerhalb von Minuten aus dem Blutstrom in den Entzündungsherd rekrutiert werden⁸. Zunächst führt die Interaktion von PSGL-1 auf den neutrophilen Granulozyten und P-/E-Selektin auf der endothelialen Seite zu einer lockeren Adhäsion der Zellen an das Endothel und zum Rollen der Zellen in Flussrichtung des Blutes^{9,10}. Hierbei kommen sie mit Chemokinen auf dem Endothel in Kontakt, was die Migration der Zellen in Richtung des Chemokingradienten stimuliert. Dies induziert eine Konformationsänderung im LFA-1-Molekül, was zu einer starken Assoziation an ICAM-1 führt¹¹ und die Wanderung durch das permeable Endothel einleitet. Nach der Transmigration wandern Neutrophile innerhalb des Gewebes entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Ursprungsherd der Entzündung. Interessant hierbei ist, dass offensichtlich „End Target“ Chemokine (fMLP, C5a) einen stärkeren chemotaktischen Reiz ausüben als diejenigen, die auf dem Endothel präsentiert werden (IL8 oder LTB4)^{12,13}. Am Entzündungsherd sezernieren Neutrophile Zytokine und Matrix-abbauende Enzyme, bilden reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und phagozytieren Mikroorganismen und Zelltrümmer¹⁴. Diese freigesetzten Substanzen können Pathogene unschädlich machen, tragen aber auch erheblich zur Gewebeschädigung bei. Neutrophile werden schließlich apoptotisch und daraufhin von Monozyten und Makrophagen phagozytiert (Efferozytose). Dieser Prozess induziert in diesen Zellen einen anti-inflammatorischen Phänotyp, der die Resolutions- und Heilungsprozesse fördert¹⁵.

Die zweite Gruppe von Immunzellen, die in den Entzündungsherd einwandert, sind Monozyten. Monozyten kommen im Blut in drei phänotypisch und funktionell verschiedenen Untergruppen vor.

Beim Menschen unterscheidet man klassische ($CD14^{++}/CD16^{-}$), nicht-klassische ($CD14^{++}/CD16^{+}$) und intermediäre Monozyten ($CD14^{+}/CD16^{++}$). In der Maus spricht man von entzündlichen ($Ly6c^{hi}$, $CCR2^{+}$, CX_3CR1^{low}), residenten ($Ly6c^{low}$, $CCR2^{-}$, CX_3CR1^{high}) und intermediären ($Ly6c^{int}$, $CCR2^{-}$, $CX_3CR1^{-/+}$) Monozyten. Man geht davon aus, dass klassische Monozyten sich nach einer gewissen Zeit im Knochenmark oder Blutstrom in die intermediäre/nicht-klassische Untergruppe umwandeln^{16,17}. Insbesondere die klassischen/inflammatorischen Monozyten wandern früh in Entzündungsherde ein, was durch MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein – 1), CCR6/CCL20 oder CCR5/MIP1 α reguliert wird^{18,19}. Innerhalb des Gewebes können sie sich in Makrophagen oder dendritische Zellen (DCs) differenzieren, die an der Beseitigung von Erregern beteiligt sind, Zelldebris entfernen, apoptische neutrophile Granulozyten aufnehmen und den Umbau des Gewebes beeinflussen.

Die genaue Funktion und das Schicksal der nicht-klassischen und intermediären Monozyten ist noch unklar. $Ly6c^{low}$ -Monozyten besitzen ein anti-entzündliches Profil, exprimieren großen Mengen des Fraktalkine-Rezeptors CX_3CR1 und ein anderes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen als die klassische Monozytenpopulation. Nicht-klassische Monozyten können auch in nicht-entzündete Gewebe einwandern, um dort die lokale Makrophagen- und DC-Populationen zu erneuern. Inwieweit $Ly6c^{low}$ -Monozyten in entzündliche Gewebe einwandern, scheint von dem jeweiligen Gewebe und dem Entzündungsstimulus abzuhängen. Während eine Thioglykollat-induzierte Peritonitis keine Rekrutierung von $Ly6c^{lo}$ -Monozyten verursacht²⁰, führt eine Listerien-induzierte Peritonitis zur raschen Einwanderung und zur Differenzierung in proinflammatorische Makrophagen²¹. $Ly6c^{lo}$ -Monozyten können sich aber auch in alternative M2-Makrophagen differenzieren, welche Reparaturprozesse fördern sowie die Angiogenese und Wundheilung stimulieren^{22–24}. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, auf der luminalen Seite des Endothels zu migrieren, um auf diese Art das Endothel nach Gefahrensignalen abzusuchen²⁵.

Resolution, Proliferation und Gewebeumbau

Auf die akute inflammatorische Phase folgen die Resolutionsphase, die proliferative Phase und schließlich der Gewebeumbau. Die Resolutionsphase ist durch einen starken Rückgang der neutrophilen Granulozyten und einen Anstieg der Makrophagenanzahl gekennzeichnet. Apoptotische neutrophile Granulozyten werden von Monozyten/Makrophagen über die Zelloberflächenexpression von Phosphatidylserin erkannt und durch Efferozytose eliminiert. Der Übergang von der akuten Entzündung in die Resolutionsphase ist aber kein passiver Prozess, sondern wird aktiv über die Bildung von Resolvinen, Lipoxinen oder Protektinen gesteuert²⁶. Resolvine sind Lipidmediatoren, die aus ungesättigten Fettsäuren gebildet werden und die Einwanderung von Neutrophilen hemmen, die Rekrutierung von Monozyten fördern und zudem die nicht-entzündliche Phagozytose und lymphatische Beseitigung von apoptotischen Neutrophilen stimulieren²⁷. Bleibt die Bildung von

I Einleitung

Resolvinen und Protektinen aus, kann es zur Entwicklung von chronischen Entzündungen und zur Fibrosierung des Gewebes kommen.

Die proliferative Phase beginnt nach etwa drei bis vier Tagen, dauert etwa drei Wochen an und ist durch Proliferation und Migration von Fibroblasten und Endothelzellen gekennzeichnet. Fibroblasten werden beispielsweise durch TGF und PDGF in den Wundbereich rekrutiert²⁸, wo sie Matrixproteine wie Hyaluronsäure, Fibronectin, Proteoglykane und Typ-1- sowie Typ-3-Prokollagen in den extrazellulären Bereich freisetzen. Diese Substanzen ersetzen die ursprüngliche Matrix aus Fibrin und Fibronectin und bilden die Grundlage für das spätere Narbengewebe. Zunächst wird das überlebende Gewebe lediglich im Randbereich der Wunde über Perfusion durch unbeschädigte Gefäße und Diffusion durch das Interstitium mit O₂ und Nährstoffen versorgt. Die Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren (w.z.B. FGF, VEGF, PDGF, Angiogenin) stimuliert aber die Bildung neuer Gefäße und innerhalb weniger Tage bildet sich ein neues verzweigtes Kapillarnetzwerk.

Die letzte Phase der Wundheilung (die sogenannte Umbauphase) ist durch einen kontinuierlichen Auf- und Abbau von Kollagen und durch Veränderung der extrazellulären Matrix gekennzeichnet^{29,30}. Der Gewebeumbau kann ein bis zwei Jahre oder gelegentlich sogar noch länger andauern^{31,32}. In dieser Zeit vergrößert sich der Durchmesser der Kollagenfasern, während Hyaluronsäure und Fibronectin abgebaut werden^{33,34}. Zudem erhöht sich der Orientierungsgrad der Fasern, und auch die Quervernetzung wird stärker. In der späteren Umbauphase werden Fibroblasten und Makrophagen apoptotisch, wodurch sich deren Anzahl wieder verringert^{35,36}. Zudem werden Neubildung und Wachstum der Gefäße gestoppt, und die metabolische Aktivität innerhalb der Wunde wird kleiner^{29,33,37}. Das Ergebnis ist ein ausgereiftes Narbengewebe mit einer niedrigen Anzahl an Zellen und einer hohen Zugfestigkeit³⁷⁻³⁹.

I.2. Darstellung von Entzündungsprozessen über bildgebende Verfahren

Entzündungsprozesse können durch die fünf klassischen Merkmale Hitze (*Calor*), Rötung (*Rubor*), Schwellung (*Tumor*), Schmerzen (*Dolor*) und eine Beeinträchtigung der Gewebefunktion (*Functio laesa*) erkannt werden, was jedoch bei Verletzungen/Infektionen innerer Organe oft schwierig ist. Weitere Kennzeichen sind generelles Unwohlsein, Fieber oder auch das Anschwellen von Lymphknoten. Jedoch gibt es viele langsam verlaufende chronische Entzündungsprozesse, die keine oder nur sehr milde klassische Entzündungssymptome verursachen und daher nur schwer zu erkennen sind. Dazu gehören das Auftreten von atherosklerotischen Plaques, abdominalen aortalen Aneurysmen oder verschiedenen Krebserkrankungen. Um Entzündungsprozesse empfindlich und spezifisch zu diagnostizieren, stellt daher die klinische Chemie verschiedene diagnostische Verfahren zur Verfügung, wie die Bestimmung der Leukozytenzahl, Veränderungen in der Leukozytenpopulation,

die Blutsenkungsgeschwindigkeit, Menge und Zusammensetzung von Serumproteinen, das Auftreten von Akute-Phase-Proteinen (C-Reaktives Protein, PCT) oder auch die Bestimmung bestimmter Zytokine (IL6, IL1). Obwohl diese allgemeinen laborchemischen Methoden sehr sensitiv sind, lässt sich hierüber gewöhnlich weder die Lokalisation noch das Ausmaß des Entzündungsherdes im Körper ermitteln.

Um Entzündungsherde innerhalb des Körpers sichtbar zu machen, werden nichtinvasive Bildgebungsmethoden wie Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomographie*), Ultraschall, Röntgen, Magnetresonanztomographie (MRT), aber auch optische Methoden eingesetzt. Durch MRT, CT, Ultraschall oder Röntgen lassen sich Informationen über strukturelle Veränderung des Gewebes gewinnen, Entzündungen bzw. Entzündungszellen lassen sich auf direktem Weg über diese Verfahren jedoch nicht darstellen. Zur Detektion von Entzündungsprozessen wurden daher in der Vergangenheit Kontrastmittel oder „Tracer“ verwendet, die sich auf zwei Arten im Entzündungsherd anreichern⁴⁰. Zum einen über den sog. EPR-Effekt (*Enhanced Permeation and Retention*), zum anderen über die Einwanderung von *ex vivo* bzw. *in vivo* markierten Immunzellen. Die Anreicherung im Entzündungsherd über den EPR-Effekt ist unspezifisch und erfordert hohe Konzentrationen im Blut, da die Diffusion von Makromolekülen ins Gewebe langsam ist⁴⁰. Beispiele für diese Art der Entzündungsdarstellung sind Gallium-Citrat⁴¹, radioaktive IgGs^{42,43}, radiomarkierte Liposomen⁴⁴ oder auch markiertes Avidin-Biotin^{45,46}. Eine weitere Einschränkung der EPR-Methode ist, dass sich bei chronischen Entzündungen die Permeabilität des Endothels oft wieder normalisiert und daher keine oder nur eine geringe passive Diffusion in das Gewebe möglich ist⁴⁰.

Spezifischer ist die direkte Darstellung der Infiltration von Immunzellen, welche entweder *ex vivo* oder durch die spezifische Ansteuerung von Leukozytenantigenen *in vivo* markiert werden. Die *ex vivo* Markierung wurde bereits in den 70er Jahren entwickelt, um die Einwanderung von Leukozyten in den Entzündungsherd über γ -Szintigraphie zu detektieren⁴⁰. Hierzu wurden dem Patienten autologe Leukozyten entnommen, mit ^{99m}Tc oder ¹¹¹In markiert und reinjiziert⁴⁷. Eine Alternative hierzu ist die direkte *in vivo* Markierung von Immunzellen über radioaktiv markierte monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente oder kleinere Liganden. Der Einsatz von radiomarkierten Antikörpern gegen Granulozyten war einer der ersten Ansätze, Leukozyten *in vivo* zu markieren⁴⁰. Zu diesem Zweck wurden Antikörper bzw. Fab-Fragmente gegen NCA (*Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 8*, bzw. CD66b, CD67) oder CD15 (SSEA-1 IgM, LeuTech®) eingesetzt. Neben diesen Antikörperderivaten wurden zur Ansteuerung von Immunzellen auch kleinere Liganden wie Peptide^{48–50} oder Zytokine (IL-1)⁵¹ verwendet.

Eine weitere Methode, um Entzündungsherde zu visualisieren, ist der Einsatz des Glukoseanalogons ¹⁸F-FDG (¹⁸F-2-Fluor-2-desoxy-D-Glukose). ¹⁸F-FDG wird über Glukosetransporter in Zellen

I Einleitung

aufgenommen, anschließend über das Enzym Hexokinase phosphoryliert^{52,53}, aber nicht weiter verstoffwechselt. ¹⁸F-FDG wird zur Detektion von Tumoren und Metastasen bei Krebspatienten eingesetzt, da erhöhte glykolytische Stoffwechselaktivität ein Merkmal vieler proliferierender Tumorzellen ist⁵⁴. ¹⁸F-FDG reichert sich aber auch in Entzündungsherden an⁵³, da aktivierte Neutrophile und Makrophagen ebenfalls im hohen Maße Glukosetransporter (insbesondere GLUT1 und GLUT3) exprimieren⁵⁵⁻⁵⁷. Die Vorteile von ¹⁸F-FDG liegen in der sehr hohen Sensitivität und der Möglichkeit von Ganzkörperaufnahmen. Nachteile sind die geringe Auflösung und, dass eine zweite Bildgebungsmodalität zur anatomischen Zuordnung der Signale eingesetzt werden muss (z.B. CT oder MRT). ¹⁸F-FDG akkumuliert zudem stoffwechselbedingt in hohem Maße im Gehirn und im Herz, was es schwierig macht, in oder in der Nähe dieser Organe Entzündungen zu detektieren.

Visualisierung von Entzündungsprozessen mittels Magnetresonanztomographie

Eine Alternative zu den oben genannten nuklearmedizinischen Verfahren ist die MRT. MRT benötigt keine ionisierende Strahlung, besitzt eine hohe räumliche Auflösung und über den gezielten Einsatz von spezifischen Bildgebungssequenzen lässt sich ein exzellenter Kontrast zwischen Geweben erzeugen. Dabei können die Spin-Relaxationseigenschaften (T1, T2 oder T2*) und die Protonendichte (PD) des Wassers bzw. des Fettgewebes zur Erzeugung von Kontrasten genutzt werden⁵⁸. Hierüber lassen sich strukturelle Veränderungen im Gewebe darstellen, wie z.B. die Bildung von Ödemen oder das Auftreten einer Fibrose, aber die Identifikation bestimmter Immunzellpopulationen ist nicht möglich. Um mittels MRT Zellen oder weitere Strukturen sichtbar zu machen, müssen exogene MR-Kontrastmittel eingesetzt werden, welche die T1-, T2-Relaxationseigenschaften des Wassers modifizieren oder einen eigenen Kontrast erzeugen⁵⁹.

Klassische T1-Kontrastmittel sind paramagnetische Gadolinium-Komplexe, welche die T1-Zeit (Spin-Gitter-Relaxation bzw. longitudinale Relaxation) des Wassers im umliegenden Gewebe verkürzen und damit indirekt zu einer Signalverstärkung führen⁶⁰. Gadolinium-Komplexe werden beispielsweise in Form des LGE (*Late Gadolinium Enhancement*) zur Darstellung des nekrotischen Gewebes nach akutem Myokardinfarkt oder zur Detektion einer Fibrose oder Myokarditis eingesetzt^{61,62}. In der Onkologie nutzt man Gd-Kontrastmittel routinemäßig zur Visualisierung von Tumoren und Metastasen⁶³. Gd-Konjugate eignen sich auch zur Darstellung von Gefäßstrukturen (kontrastverstärkte MR-Angiographie)⁶⁴ und über die Kopplung von spezifischen Liganden wurden Gd-Verbindungen auch erfolgreich zur Detektion von Thromben eingesetzt⁶⁵⁻⁶⁸. In der jüngsten Vergangenheit sind Gd-Konjugate jedoch in die Kritik gekommen, da es im Fall der linearen Komplexbildner (z.B. DTPA) zur Gewebeablagerung von nicht komplexiertem Gd³⁺ kommen kann. Freies Gd³⁺ ist als Ca²⁺-Antagonist sehr toxisch und wird bei niereninsuffizienten Patienten mit der Entstehung einer systemischen nephrogenen Fibrose in Verbindung gebracht⁶⁹. Kürzlich hat man zudem in Patienten mit normaler

Nierenfunktion, denen wiederholt Gd-Kontrastmittel verabreicht wurde, Ablagerungen von Gd^{3+} im Gehirn nachgewiesen^{70,71}.

Paramagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIOs = *Small Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) sind eine andere weit verbreitete Klasse von Kontrastmitteln, die zu den T2-Kontrastmitteln gehören. SPIOs besitzen eine Größe von 50 -100 nm und sind zumeist mit einer Hülle aus Dextran oder Carboxydextran umgeben. In der experimentellen Forschung und auch in der Klinik werden SPIOs zur Detektion von Tumoren (v.a. in der Leber) und von Entzündungsprozessen eingesetzt, da SPIOs von Monozyten und Makrophagen aufgenommen werden^{72,73}. Mittels MRT wurde auch das Schicksal von transplantierten SPIO-markierten Progenitor- bzw. Stammzellen *in vivo* untersucht⁷⁴. USPIOs (*Ultra Small Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) haben einen Durchmesser von weniger als 50 nm, besitzen eine längere Blut-Halbwertszeit und können daher auch als Kontrastmittel für die MR-Angiographie genutzt werden⁷⁵. Der Vorteil der Eisenoxid-Partikel beruht darauf, dass sie eine große Anzahl an Eisenatomen enthalten, was schon bei geringen Partikelkonzentrationen zu einem nachweisbaren Signal führt. Nachteile sind aber, dass es zu einer Abschwächung oder Auslöschung des 1H -Signals aufgrund von erheblich verkürzten T2-Zeiten (T2 bzw. T2*) des umliegenden Wassers kommt. Da es jedoch im MRT-Bild je nach Gewebe aber insbesondere an Grenzflächen (Gefäßwände, Lunge) viele Bereiche mit unterschiedlich starken Kontrasten gibt, kann die Interpretation dieser Bilddaten schwierig sein.

Neben den oben genannten T1- und T2-Kontrastmitteln existieren noch CEST-Kontrastmittel (CEST = *Chemical Exchange Saturation Transfer*). Die Erzeugung eines CEST-Kontrastes beruht nicht auf den Relaxationseigenschaften des Wassers, sondern auf der Übertragung der Signalsättigung einer Probe in der Regel auf das umliegende Wasser. Dabei werden zunächst die 1H -Protonen einer Aminogruppe oder Amidgruppe über einen frequenzspezifischen Puls gesättigt. Tauschen sich diese Protonen mit denen des umliegenden Wassers aus, so wird die Sättigung auf das Wasser übertragen und schwächt dessen Signal ab⁵⁹. CEST-Kontraste lassen sich dazu nutzen, um endogene Strukturveränderungen zu visualisieren oder um exogene CEST-Kontrastmittel zu detektieren⁷⁶.

Inflammationsbildgebung über 1H -/ ^{19}F -Magnetresonanztomographie

Neben 1H -Protonen können auch andere Kerne wie ^{13}C , ^{23}Na etc. oder auch ^{19}F -haltige Substanzen über MRT detektiert werden (^{19}F -MRT). Die Möglichkeit, ^{19}F -MRT zu medizinischen Bildgebungszwecken einzusetzen, wurde schon im Rahmen der ersten ^{19}F -MRT Untersuchungen (CaF₂-Lösung, Perfluorotributylamin (FC43)) in Betracht gezogen⁷⁷. Die Gründe hierfür sind, dass das natürlich vorkommende stabile Isotop ^{19}F ein hohes gyromagnetisches Verhältnis besitzt (1H = 42,58 MHz/T, ^{19}F = 40,05 MHz/T), eine natürliche Häufigkeit von 100 % aufweist^{77,78} und im Körper in nur

I Einleitung

sehr geringen Konzentrationen vorkommt und daher Signale aus ^{19}F -haltigen Substanzen eine hohe Spezifität aufweisen⁷⁹. Zudem lassen sich die ^{19}F -Bilder mit korrespondierenden ^1H -Bildern überlagern, was die exakte anatomische Lokalisation der ^{19}F -Substanzen als „Hot Spot“ ermöglicht⁸⁰.

Eine Klasse von Molekülen, die sich zur Erzeugung von ^{19}F -Kontrastmitteln besonders eignet, sind Perfluorkarbone. Hierbei handelt es sich um perfluorierte Alkane, die einen hohen Anteil an ^{19}F -Atomen besitzen. Perfluorkarbone werden seit mehr als 40 Jahren untersucht und gehören zu den biologisch inertesten Molekülen, die jemals produziert wurden⁸¹. Die Stabilität beruht sowohl auf der C-F-Bindung, die zu den stärksten kovalenten Bindungen gehört, als auch auf der elektronendichten Hülle⁸². Aufgrund ihrer ^{19}F -Hülle sind Perfluorkarbone sowohl hydrophob als auch lipophob und können daher als Rohsubstanzen nicht in biologischen Systemen eingesetzt werden. Daher werden sie in den meisten Fällen über Hochdruckhomogenisatoren oder Mikrofluidizer mit Phospholipiden (aus Eigelb oder Soja) emulgiert^{83,84}. Bei diesen Herstellungsverfahren entstehen Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs), die einen hydrodynamischen Durchmesser von 100-200 nm besitzen. Die Emulsionspartikel bestehen dabei aus einem Perfluorkarbon-Kern, der von einer Lipideinzelschicht umgeben ist. Alternativ können Perfluorkarbone aber auch über Poloxamere (z.B. Pluronic F68) emulgiert oder in PLGA (Polylactid-co-Glycolid), einem Polymer aus Milchsäure und Glykolsäure, eingekapselt werden^{85,86}.

Schon in frühen Arbeiten zur ^{19}F -MRT gab es Hinweise darauf, dass PFCs zur Darstellung von Entzündungen geeignet sein könnten⁸⁷⁻⁸⁹. Diese Befunde wurden aber nicht weiter verfolgt und durch zusätzliche Methoden validiert. Die erste systematische Untersuchung zur Darstellung von Monozyten und Makrophagen mittels ^{19}F -MRT nach Herzinfarkt und Schlaganfall in der Maus wurde 2008 veröffentlicht⁹⁰. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von *in vivo* markierten Monozyten/Makrophagen im Infarktbereich des Herzens und des Gehirns nichtinvasiv dargestellt werden kann. Über weitere Techniken wie Dichtegradientenzentrifugation des Blutes, Durchflusszytometrie und Immunohistochemie wurde nachgewiesen, dass PFCs im Blutstrom von Monozyten aufgenommen werden und dass diese im Infarktgewebe mit Monozyten und Makrophagen kolokalisieren⁹⁰. In nachfolgenden Untersuchungen zur ^{19}F -MRT wurde dies anhand weiterer klinisch relevanter Entzündungsmodelle (LPS-induzierte Lungenentzündung⁹¹, Transplantatabstoßung⁹², Kollagen-induzierte Arthritis⁹³ oder eine virale Myokarditis⁹⁴) und durch weitere Untersuchungen unabhängiger Gruppen bestätigt⁹⁵⁻¹⁰².

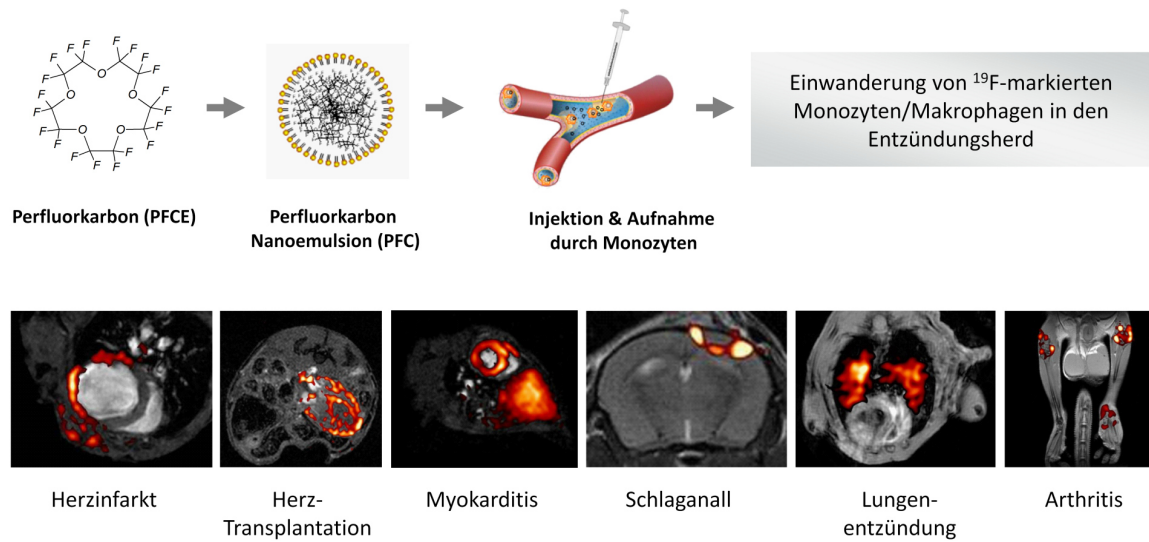


Abbildung 1: $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT zur Darstellung von Entzündungen: Perfluorkarbonate werden zur Herstellung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) mit Lipiden emulgiert. Nach intravenöser Injektion der PFCs werden diese im Blutstrom von Monozyten aufgenommen, welche daraufhin in den Entzündungsherd einwandern. Die Akkumulation von ^{19}F -beladenen Monozyten oder Makrophagen kann als lokales ^{19}F -Signal detektiert werden, und durch Überlagerungen des ^1H -(grau) und des korrespondierenden ^{19}F -Signals (rot) lässt sich die anatomische Lokalisation des ^{19}F -Signals eindeutig bestimmen. Abbildung verändert nach Grapentin *et. al.* (2014)⁸³.

I.3. Zielsetzung der Arbeit

1. ¹⁹F-MRT-vermittelte Visualisierung von Zellen mit endozytischen Eigenschaften

In den bisherigen Studien wurden PFCs im Wesentlichen zur Darstellung der akuten Phase einer Entzündungsreaktion eingesetzt, wobei insbesondere Monozyten und Makrophagen markiert wurden. Nach der intravenösen Applikation der PFCs wird die Lokalisation des *in vivo* beobachteten ¹⁹F-MRT-Signals dann zumeist mittels Histologie oder Durchflusszytometrie überprüft. Dazu werden PFCs eingesetzt, die mit zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden.

Neben Monozyten und Makrophagen besitzen jedoch eine Vielzahl weiterer Zelltypen endozytische Eigenschaften, wie z.B. neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, B-Zellen, aber auch Bindegewebezellen oder Progenitorzellen. Daher sind prinzipiell auch diese Zellen in der Lage, PFCs aufzunehmen. Zudem war unbekannt wie sich das ¹⁹F- und das Fluoreszenzsignal nach zellulärer Aufnahme über die Zeit entwickelt. Daher wurden diese zwei Aspekte in Projekten untersucht, die sich im Rahmen von Entzündungsprozessen mit der Aufnahme von PFCs durch verschiedene Zelltypen [OA1+OA2] und mit dem Verlauf des ¹⁹F- und des Fluoreszenzsignals nach zellulärer Aufnahme von PFCs befassen [OA3].

2. Aktives Targeting von PFCs

Für die Spezifität und die Anwendungsbandbreite der ¹⁹F-MRT Technologie wäre es ein großer Fortschritt, wenn sich neben Zellen mit starken endozytischen Eigenschaften auch Strukturen oder individuelle Zelltypen unabhängig von deren Endozytosekapazität über PFCs *in vivo* ansteuern ließen. Daher war ein Ziel der letzten Jahre, am Institut für Molekulare Kardiologie eine Plattformtechnologie zum aktiven Targeting von PFCs aufzubauen. Durch Oberflächenmodifikation der Partikel sollte die unspezifische Aufnahme von PFCs durch Monozyten und Makrophagen unterbunden und darauf aufbauend die Partikeloberfläche mit spezifischen Liganden modifiziert werden. Die prinzipielle Machbarkeit eines spezifischen Targetings sollte dann anhand der Darstellung von frühen Thromben [OA4] bzw. über das Ansteuern von individuellen Cargo-Internalisierungsrezeptoren [OA5] ermittelt werden.

3. ¹⁹F-MRT von PFCs mit komplexer spektraler Signatur

Gewöhnlich werden für die ¹⁹F-Bildgebung PFC-Emulsionen eingesetzt, die PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) als ¹⁹F-Quelle enthalten. PFCE besitzt aufgrund von 20 magnetisch äquivalenten ¹⁹F-Atome nur ein ¹⁹F-Signal, aber eine sehr lange biologische Halbwertszeit. Perfluorokarbonate mit kurzen biologischen Halbwertszeiten besitzen komplexe ¹⁹F-Spektren, die über herkömmliche ¹⁹F-MRT-Bildgebung nicht fehlerfrei dargestellt werden können. Daher sollten Techniken etabliert werden, die eine artefaktfreie Bildgebung von PFCs mit komplexen ¹⁹F-Spektren ermöglichen [OA6, OA7].

II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

II.1 ^{19}F -MRT von Zellen mit endozytischen Eigenschaften

Die Darstellung von entzündlichen Prozessen durch ^{19}F -MRT beruht vor allem auf der zellulären Aufnahme von PFCs durch zirkulierende oder lokale Monozyten und Makrophagen (s. Abb. II.1). Jedoch besitzen auch andere Zellen starke endozytische Eigenschaften, wie neutrophile Granulozyten, B-Zellen, dendritische Zellen, aber auch Endothelzellen, Fibroblasten oder mesenchymale Stammzellen. Obwohl in den bisherigen Untersuchungen die ^{19}F -Markierung insbesondere in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen wurde^{90,91}, sind prinzipiell eine Vielzahl an Zelltypen in der Lage, PFCs aufzunehmen.

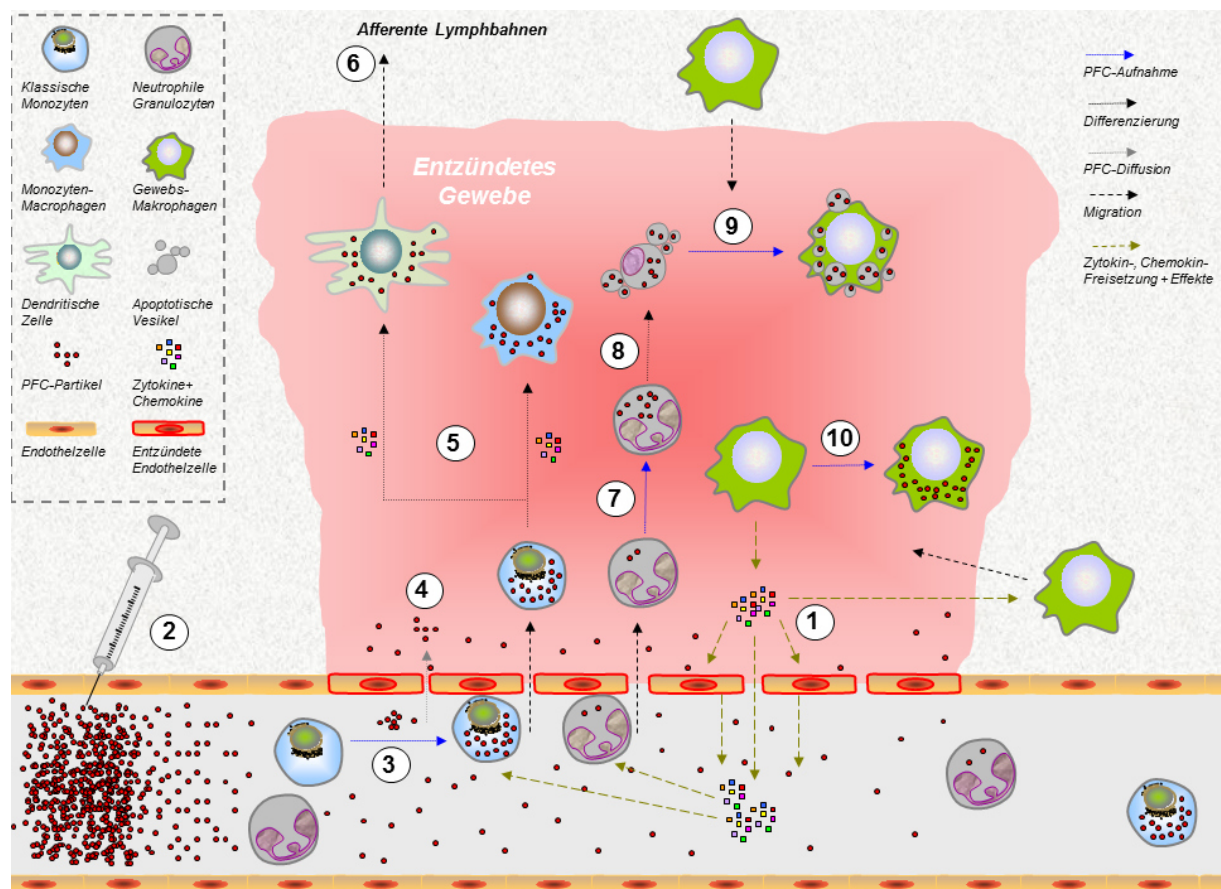


Abbildung II.1: ^{19}F -Markierung von Entzündungszellen: Bei einer Entzündung kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die Makrophagen aus den umliegenden Geweben rekrutieren und Endothelzellen aktivieren (1). Neutrophile Granulozyten und Monozyten nehmen intravenös injizierte PFCs im Blutstrom auf (3) und wandern in den Entzündungsherd ein. Eingewanderte Neutrophile und Monozyten können lokal weitere PFCs aufnehmen (7), gehen aber über die Zeit in Apoptose (8) und werden durch Makrophagen phagozytiert (9). Monozyten differenzieren sich in Makrophagen und dendritische Zellen (5), wobei aufgrund der Stabilität der PFCs die ^{19}F -Markierung während dieses Differenzierungsprozesses erhalten bleibt. Makrophagen und Dendritische Zellen können über die afferenten Lymphbahnen den Entzündungsbereich verlassen, in die regionalen Lymphknoten auswandern und auf diesem Wege PFCs auch in die Lymphknoten transportieren (6). Aufgrund der geringen Größe (100 nm) können PFCs auch passiv durch das permeable Endothel in das entzündete Gewebe diffundieren (4), wo sie von lokalen Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen werden (10). Abbildung modifiziert nach Temme *et al.* (2012)¹⁰³.

II Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen Ergebnisse von drei Originalarbeiten [OA] beschrieben, welche verschiedene Aspekte zum Tracking von Zellen mittels ^{19}F -MRT genauer beleuchten: Zunächst wird anhand eines neu entwickelten Entzündungsmodells dargelegt, dass sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten sequentiell über ^{19}F -MRT dargestellt werden können und dass sich dieses dazu eignet, den kompletten Entzündungsverlauf abzubilden [OA1]. Die zweite Arbeit befasst sich damit, dass auch epikardiale mesenchymale Progenitorzellen (EPDCs) des Herzens über ^{19}F -MRT visualisiert werden können [OA2]. In der dritten Arbeit wird der Verlauf des Fluoreszenz- und des ^{19}F -Signals nach zellulärer Aufnahme von fluoreszenzmarkierten „Dual Contrast“ PFCs untersucht [OA3].

II.1.1 ^{19}F -MRT von Neutrophilen und Monozyten im Verlaufe eines Entzündungsprozesses

Um die sequentielle Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen unter definierten Bedingungen darstellen zu können, haben wir in Mäusen ein experimentelles Entzündungssystem entwickelt, welches auf der subkutanen (s.c.) Implantation von Matrigel^a basiert. Matrigel ist bei 4 °C flüssig, geht aber bei 37 °C in einen gelartigen Zustand über, was bedeutet, dass das Matrigel nach der subkutanen Applikation nicht verläuft, sondern als Gel lokal erhalten bleibt. Durch vorherige Dotierung des flüssigen Matrigels mit LPS (Lipopolysaccharid) lässt sich auf diese Weise ein lokaler Entzündungsherd erzeugen.

Nichtinvasive $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Darstellung des Entzündungsverlaufes im Matrigel/LPS-Modell

Zunächst sollte das subkutan implantierte Matrigel mittels ^1H -MRT lokalisiert und anschließend die Infiltration der Entzündungszellen über entsprechende ^{19}F -Messungen detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass implantiertes Matrigel aufgrund seiner Struktur bei T2-gewichteten Sequenzen sehr hell erscheint und sich daher exzellent vom umliegenden Gewebe abgrenzen lässt (Abb. II.2A). Um die eingewanderten Entzündungszellen darzustellen, wurden PFCs intravenös (i.v.) injiziert und ca. 24 h nach der Injektion ^1H - und ^{19}F -Messungen durchgeführt. Um die Spezifität des ^{19}F -Signals im Entzündungsherd zu überprüfen, wurde als Kontrolle auch Matrigel ohne LPS eingesetzt. In beiden Fällen findet man ^{19}F -Signale in Lymphknoten und dem Knochenmark, jedoch nur beim LPS-haltigen Matrigel die Anreicherung von ^{19}F -Signal im Randbereich des Matrigels (Abb. II.2B).

Um den Entzündungsverlauf in dem Matrigel/LPS-System über die Zeit darzustellen, wurden PFCs zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 4, 9, 19) i.v. injiziert und 24 h später $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen durchgeführt. Anhand der anatomischen ^1H -Bilder ist zu erkennen, dass s.c. implantiertes Matrigel über einen Zeitraum von 20 Tagen stabil ist und eindeutig dargestellt werden kann (Abb. II.2C, obere

^a Hierbei handelt es sich um extrazelluläre Matrix aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Tumor.

Reihe). Die korrespondierenden ^{19}F -Bilder (mittlere Reihe), sowie die quantitative Analyse des ^{19}F -Signals (Abb. II.2D) zeigen die stärkste ^{19}F -Anreicherung nach 24 h und einen starken Abfall über die folgenden 20 Tage.

Das ^{19}F -Signal im Matrigel korreliert mit Anzahl und Verteilung der Immunzellen im Matrigel

Um zu überprüfen, ob das ^{19}F -Signal mit der Anzahl der Immunzellen übereinstimmt, wurden Matrigele mit LPS nach 12 h und 24 h bzw. nach 3, 10 und 20 Tagen entnommen, die Zellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie wurde die Gesamtzahl der Immunzellen (CD45^+) bestimmt. Innerhalb der ersten 24 h kommt es zu einem starken Anstieg der Zellzahl und danach bis zum Tag 20 wieder zu einem kontinuierlichen Abfall. Vergleicht man nun die Immunzellzahl mit dem ^{19}F -Signal und der äußerlichen Wunde, so zeigt sich, dass alle drei Parameter einen ähnlichen Verlauf haben (Abb. II.2C+D, Abb. II.3A).

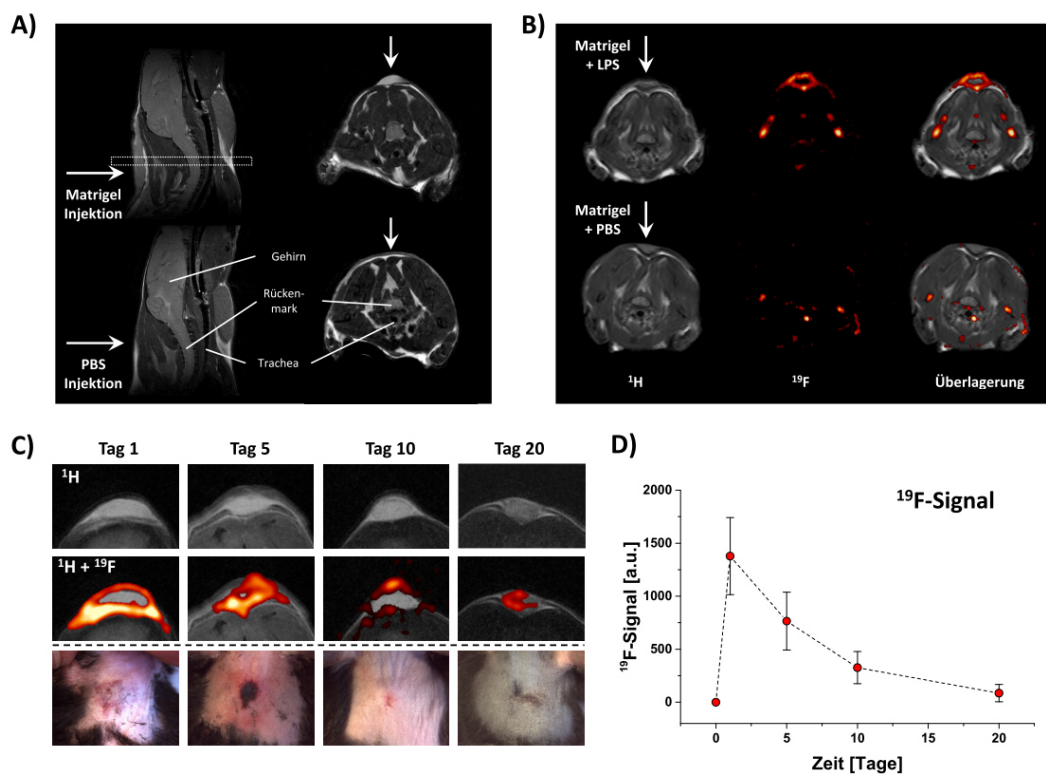


Abbildung II.2: ^1H -/ ^{19}F -MRT-Darstellung der Infiltration von Entzündungszellen in LPS-beladene Matrigele: (A) Anatomische Lokalisation des Matrigels. Es wurden 50 μl Matrigel (oben) oder PBS als Kontrolle (unten) s.c. injiziert. Anatomische ^1H -Bilder wurden mit einer T2-gewichteten Turbo-Spin-Echo-Sequenz (TSE) aufgenommen. Sagittale und axiale Schichten zeigen die Position der Matrigel-Injektion an (Pfeil). Das gestrichelte weiße Rechteck entspricht der Position der axialen Schichten auf der rechten Seite. (B) ^1H -/ ^{19}F -MRT nach s.c. Implantation von Matrigel/LPS bzw. Matrigel/PBS als Kontrolle (unten). PFCs wurden 24 h nach der Implantation intravenös verabreicht, und nach weiteren 24 h erfolgten ^1H -/ ^{19}F -Messungen. Pfeile zeigen die Lokalisation des Matrigels an. (C) ^{19}F -Signal nach PFC-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS/Matrigel-Implantation. Oben: ^1H -Bilder, Mitte: ^{19}F -Bilder, Unten: Aufsicht auf die Nackenregion, welche die Stelle der Matrigel-Implantation zeigt. (D) Quantitative Analyse des ^{19}F -Signals im Entzündungsherd über die Zeit. Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2014) [OA1].

II Ergebnisse und Diskussion

In Abb. II.3 sind repräsentative Bilder von Kryoschnitten des Matrigels mit und ohne LPS vier Tage nach Implantation dargestellt. Die H&E-Färbung zeigt das retikuläre Kollagen-Netzwerk des Matrigels (rot) und im Falle der Matrigele mit LPS deutliche zelluläre Infiltrate (lila) in der Randzone, die interessanterweise mit dem Kollagennetzwerk assoziiert vorlagen. Immunhistochemische Untersuchungen mit anti-CD11b-Antikörpern (markieren Neutrophile, Monozyten und Makrophagen), belegten eine starke Anreicherung von CD11b⁺-Zellen im Randbereich LPS-dotierter Matrigele, wohingegen nur eine sehr geringe Anzahl CD11b⁺-Zellen in Kontrollen ohne LPS vorhanden waren. Warum sich Immunzellen speziell im Randbereich des Matrigels anreichern, ist bisher unklar. Möglich ist, dass das LPS zu Beginn von lokalen Makrophagen und Mastzellen erkannt wird, welche daraufhin Chemokine sezernieren und damit einen Chemokingradienten im Randbereich erzeugen, aber auch bestimmte Stoppsignale sind denkbar^{12,104}.

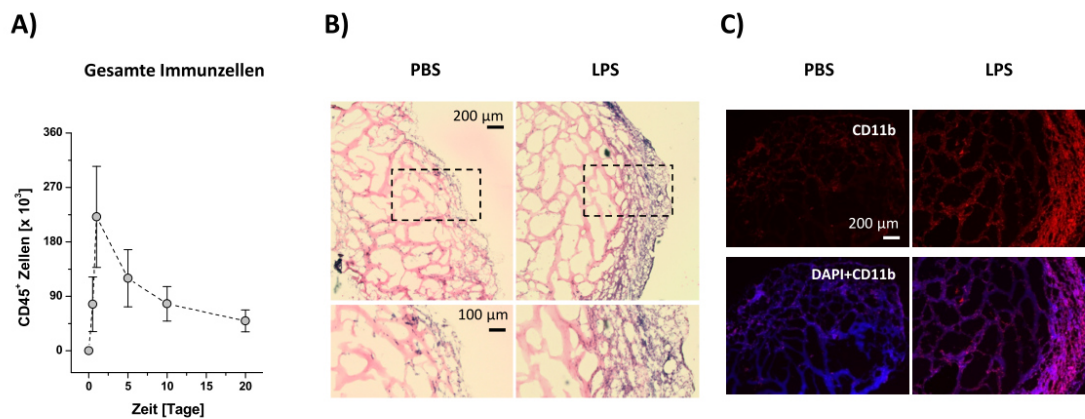


Abbildung II.3: Immunzellinfiltration: (A) Matrigele mit LPS wurden nach 4 h, 12 h, 5 d, 10 d, 20 d entnommen und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Gesamtimmunzellzahl untersucht. (B) H&E-Färbungen von Matrigelen mit/ohne LPS, die vier Tage nach Implantation entnommen wurden. Das Kollagennetzwerk erscheint rötlich, die eingewanderten Zelle lila. Die Kästen stellen vergrößerte Bereiche dar (unten). (C) Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen CD11b (rot) zeigen die Einwanderung myeloischer Immunzellen in Matrigel mit LPS (rechts) bzw. ohne LPS (links). Zellkerne wurden über DAPI (blau) gefärbt. PBS = Kontrolle ohne LPS; LPS = Matrigel mit 50 μ g LPS (rechts). Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2014) [OA1].

Veränderungen der Immunzellpopulationen im Entzündungsverlauf

Um die Zusammensetzung der Immunzellen im Matrigel näher zu charakterisieren, haben wir durchflusszytometrische Analysen der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation durchgeführt. Erwartungsgemäß waren an Tag 1 neutrophile Granulozyten die dominante Zellpopulation ($> 10^5$). Deren Anzahl wurde über die Zeit konstant niedriger und betrug nach 20 Tagen nur noch ca. 10 % der Menge von Tag 1 (Abb. II.4A). Im Gegensatz dazu waren zu Beginn keine Makrophagen nachweisbar, aber nach 3 Tagen konnte eine kleine Anzahl an Makrophagen detektiert werden ($\sim 3 \times 10^3$), deren Anzahl sich bis zum Tag 10 mehr als verzehnfachte. Schließlich überstieg an Tag 20 die Anzahl der Makrophagen die der neutrophilen Granulozyten um mehr als den Faktor 2.

Um zu überprüfen, ob das Matrigel/LPS-Modell auch dazu geeignet ist, die Differenzierung infiltrierender Monozyten in phänotypisch und funktionell unterschiedliche Makrophagensubtypen zu untersuchen, haben wir die Expression von Ly6c, Dectin-1, CD206 und MHCII über Durchflusszytometrie im Zeitraum von 5-20 Tagen nach Implantation des LPS-haltigen Matrigels untersucht. Im Verlauf der Resolutionsphase verringerte sich der Anteil an Ly6c^{hi}-Makrophagen, wohingegen der Anteil an Ly6c^{low}-Makrophagen insbesondere zwischen Tag 10 und 20 stark angestiegen ist (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Anzahl an MHCII-exprimierenden Makrophagen sowie die Expressionsstärke von CD206 und Dectin-1 (Abb. III.4B). Diese Veränderungen hinsichtlich der Expression von MHCII, CD206 und Dectin-1 stimmen mit einer Polarisierung in Richtung M2-Makrophagen überein^{105–107}.

Mittels ¹⁹F-MRT konnten wir zeigen, dass die sequentielle Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten dargestellt werden kann und dass dieses dazu geeignet ist, einen kompletten Entzündungsverlauf bis zur Heilung zu verfolgen.

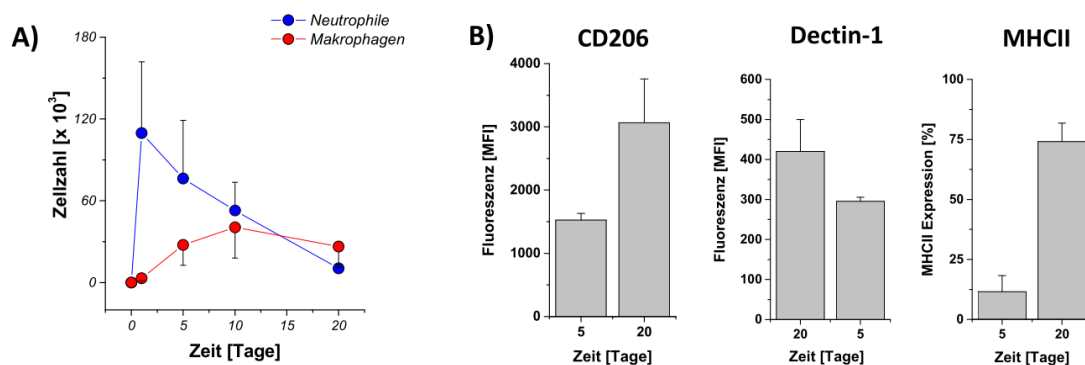


Abbildung II.4: Veränderungen der Immunzellpopulationen: (A) Zusammensetzung der CD11b⁺-Immunzellen im Matrigel/LPS. **(B)** Expression von CD206, Dectin-1 (intrazellulär) und MHCII (Zelloberfläche) 5 bzw. 20 Tage nach Matrigel-Implantation. Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2014) [OA1].

II.1.2 Tracking von epikardialen mesenchymalen Progenitorzellen (EPDCs)

Neben Monozyten und Makrophagen besitzen auch andere Zellen starke endozytische Eigenschaften. Dazu gehören beispielsweise Fibroblasten, die auf diesem Wege an der Beseitigung von Kollagen und apoptotischen Neutrophilen beteiligt sind^{108,109}. Auch verschiedene Stamm- und Progenitorzellen besitzen endozytische Eigenschaften^{110,111}, deren Funktionen aber bisher recht unerforscht sind.

Epikardiale mesenchymale Progenitorzellen (EPDCs) leiten sich vom Epikard ab, welches die äußere mesotheliale Schicht des Herzens umfasst. Das Epikard fungiert während der embryonalen Entwicklung als Quelle von multipotenten Vorläuferzellen, die nach der Geburt jedoch in einen ruhenden Zustand übergehen¹¹². Nach einem akuten Myokardinfarkt (MI) können epikardiale Zellen

II Ergebnisse und Diskussion

reaktiviert werden und durchlaufen daraufhin eine epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT), wodurch sich ein Teil der Zellen zu EPDCs umwandelt. EPDCs können in das verletzte Myokard einwandern, wo sie sich in eine Vielzahl kardiovaskulärer Zelltypen differenzieren können, wie z.B. in glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten oder zu einem geringeren Anteil auch in Kardiomyozyten^{113–116}. EPDCs besitzen eine zentrale – aber bisher unverstandene – Bedeutung für kardiale Reparaturprozesse, und ein tieferes Verständnis der Biologie dieser Zellen könnte neue therapeutische Strategien für die Behandlung der ischämischen Herzkrankheit eröffnen.

Markierung von EPDCs durch Injektion von PFCs an Tag 4 nach MI

EPDCs bilden in der Ratte ca. 3-7 Tage nach MI eine ca. 100-150 µm dicke Schicht in dem Randbereich des Herzens, der vom Infarkt am stärksten betroffen ist¹¹⁶. Injiziert man PFCs nicht frühzeitig nach MI, sondern an Tag 3 oder 4, ist das ¹⁹F-Signal insbesondere im epikardialen Bereich des Herzens lokalisiert (Abb. II.5A). Da zu diesem Zeitpunkt die Einwanderung von Monozyten/Makrophagen in das verletzte Herz nur noch sehr gering ist, lag die Vermutung nahe, dass in diesem Fall das ¹⁹F-Signal nicht von Makrophagen stammt.

Um zu überprüfen, ob das ¹⁹F-Signal im Randbereich des Herzens durch die zelluläre Aufnahme von PFCs durch EPDCs stammt, wurde zunächst eine Methode entwickelt um EPDCs zu isolieren. Durch Kollagenaseverdau der Oberfläche des Herzens war es möglich die Zellen der epikardialen Schicht abzulösen. Um EPDCs in dieser Zellsuspension zu identifizieren, haben wir anschließend eine durchflusszytometrische Analyse der primär isolierten EPDCs etabliert. Durch optimierte Einstellungen des Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulichts, der Eigenfluoreszenz und Färbungen gegen CD45 und CD11b war es möglich, EPDCs und Immunzellen eindeutig zu unterscheiden (Abb. II.5B). Nach Injektion von Rhodamin-markierten PFCs und anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Zellen konnten wir nachweisen, dass nahezu alle von der Oberfläche des Herzen isolierten EPDCs Rhodamin-PFCs aufgenommen hatten (Abb. II.5B). Dass es sich bei den CD45-/CD11b- Zellen um EPDCs handelt, wurde zudem über die Oberflächenexpression der Progenitormarker PDGRα, CD73, CD105 und CD90 belegt (Abb. II.5B unten). Ferner wurden die jeweiligen Populationen (EPDCs, Makrophagen, Lymphozyten) durchflusszytometrisch isoliert und anschließend für 7 Tage kultiviert. In der Präparation der Zellen, die nicht sortiert wurde, erkennt man adhärente spindelförmige EPDCs, die auch in der Isolation der CD45-/CD11b-negativen Population zu erkennen sind. Im Falle der isolierten Lymphozyten- und Makrophagen-Fraktionen sind jedoch keine Zellen angewachsen.

Da EPDCs durch lokale Proliferation von Vorläuferzellen entstehen, bestand die Frage, wie EPDCs mit PFCs in Kontakt kommen. Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Epikards nach MI konnten permeable Endothelien innerhalb der verdickten Schicht des Epikards identifiziert werden [s. OA3]. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass in diesem Fall PFCs in den epikardialen Bereich

diffundieren können, wo sie von EPDCs aufgenommen werden und sich in diesen Zellen anreichern. Welchen biologischen Hintergrund die endozytotischen Fähigkeiten der EPDCs haben, ist bisher jedoch unklar.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit zeigt, dass - zusätzlich zu phagozytischen Immunzellen - auch epikardiale mesenchymale Progenitorzellen (EPDCs) eine hohe Endozytosefähigkeit aufweisen, lokal mit PFCs beladen werden und daher nach MI über ^{19}F -MRT visualisiert werden können.

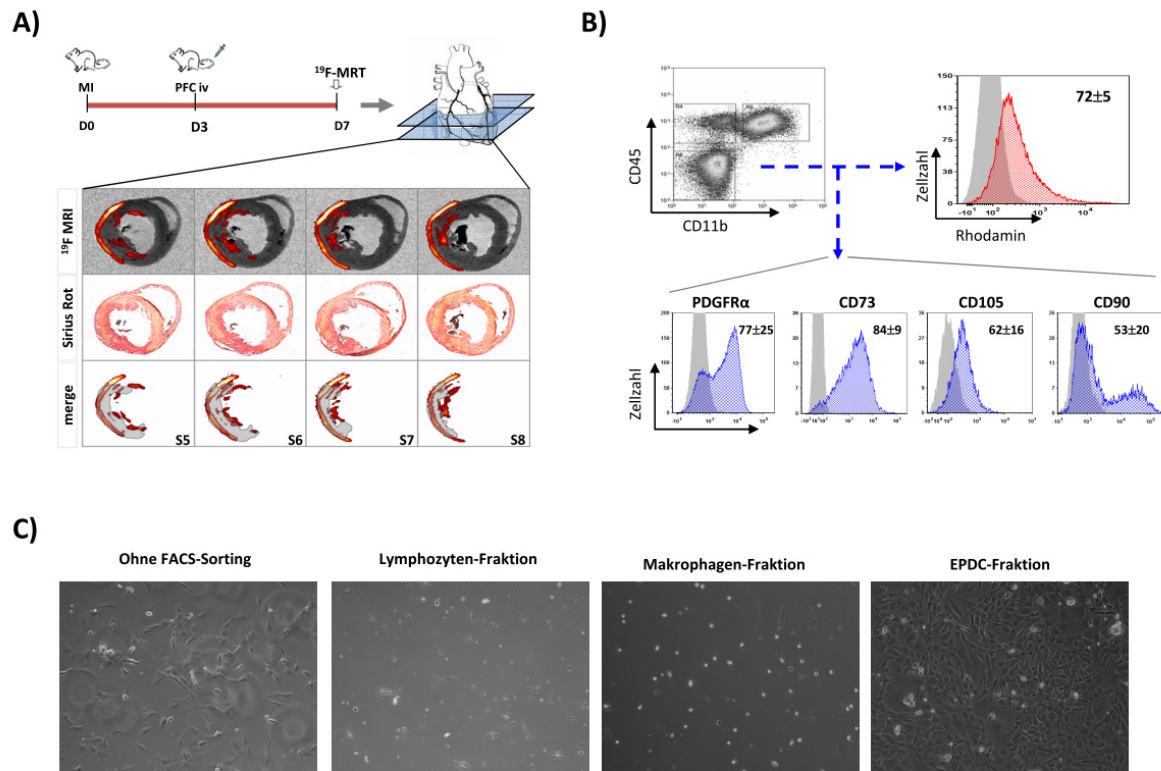


Abbildung II.5: ^{19}F -MRT von EPDCs nach MI: (A) Oben: PFC-Injektionen erfolgten drei Tage nach MI; Darstellung der Schnittebenen für MRT und Histologie. Unten: Überlagerung von *ex vivo* ^1H -/ ^{19}F -MRT Messungen (obere Reihe). Korrespondierende Sirius-Rot-Färbungen (mittlere Reihe) und Überlagerung des Infarktgebietes mit dem ^{19}F -Signal (untere Reihe). (B) Durchflusszytometrische Identifikation und Analyse von primär isolierten EPDCs. (C) Kultivierung von Zellen ohne FACS-Sorting bzw. Kultur der Zellfraktionen entsprechend der CD45/CD11b Gatingstrategie aus „B“. Abbildung modifiziert nach Ding *et al.* (2016) [OA2].

II.1.3 Dissoziation von ^{19}F - und Fluoreszenzsignal nach zellulärer Aufnahme von PFCs

Fluoreszenzmarkierte PFCs werden häufig dazu verwendet, die Lokalisation des *in vivo* beobachteten ^{19}F -MRT-Signals durch post-mortem Analysen wie Histologie oder Durchflusszytometrie zu bestätigen. Jedoch gibt es bisher keine systematischen Analysen darüber, wie sich das Verhältnis des ^{19}F - und Fluoreszenzsignals nach Aufnahme in Zellen über die Zeit entwickelt. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden PFCs mit Carboxyfluorescein ($^{\text{cf}}$ PFCs) bzw. Rhodamin ($^{\text{rho}}$ PFCs) (Abb II.6)

II Ergebnisse und Diskussion

markiert und die zelluläre Aufnahme sowie die Stabilität des ^{19}F - bzw. Fluoreszenzsignals *in vitro* und *in vivo* untersucht.

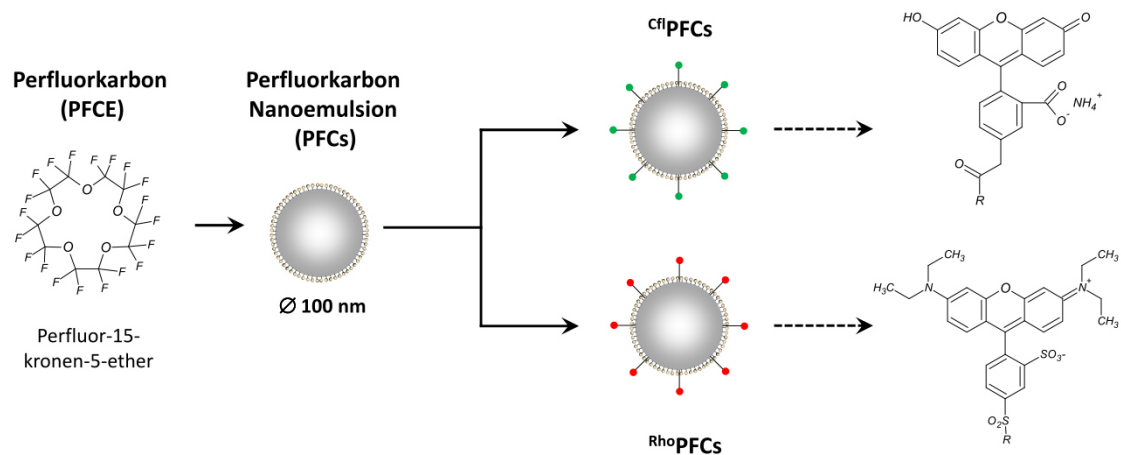


Abbildung II.6: Herstellung von CflPFCs und RhoPFCs : PFCs mit Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE) als ^{19}F -Quelle und einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 100 nm wurden über Hochdruckhomogenisation hergestellt. Zur Erzeugung von "Dual Contrast" PFCs wurden während der Herstellung Carboxyfluorescein- (Cfl) bzw. Rhodamin-markierte (Rho) Lipide hinzugefügt. Rechts sind die Strukturformeln der Cfl- bzw. der Rho-Moleküle dargestellt. Abbildung angepasst nach Bouvain *et al.* (2018) [OA3].

Die zelluläre Aufnahme von PFCs führt zur Reduktion des Fluoreszenz-, nicht aber des ^{19}F -Signals

Die Endozytose von CflPFCs bzw. RhoPFCs wurde zunächst anhand zweier Makrophagenlinien (J774, RAW) sowie von CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovarian*) untersucht. Diese Zellen wurden über 24 h mit CflPFCs (bzw. RhoPFCs) inkubiert und das Fluoreszenzsignal zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie erwartet, zeigten sich starke Signale in J774- und RAW-Makrophagen, wohingegen die nicht-phagozytischen CHO-Zellen nur eine geringe CflPFC - oder RhoPFC -Aufnahme zeigten (Abb. II.7A). Interessanterweise führte jedoch die Inkubation von J774/RAW für 24 h mit CflPFCs zu einer starken Verringerung des Fluoreszenzsignals. Um zu bestätigen, dass die PFCs tatsächlich von den Zellen aufgenommen werden, wurden die Zellen mit PEGylierten PFCs inkubiert, was die zelluläre Aufnahme nahezu vollständig aufhob (II.7A, grau).

Im nächsten Schritt wurde das ^{19}F -Signal nach 2 h und 24 h mittels ^1H -/ ^{19}F -MRT untersucht (II.7B). Das Zellpellet wurde über T2-gewichtete ^1H -MRT dargestellt (Pfeil), und anschließend erfolgten ^{19}F -Messungen über diesen Bereich. Wie man in Abb. II.7B erkennen kann, steigt das ^{19}F -Signal in J774- und RAW-Makrophagen von 2 h bis 24 h deutlich an. Offenbar erfolgt eine kontinuierliche Aufnahme der PFCs durch Makrophagen, was über die Zeit zu erheblich stärkeren ^{19}F -Signalen führt. Im Gegensatz zu den J774-/RAW-Makrophagen zeigten die CHO-Zellen bei den ^{19}F -MRT Messungen

insgesamt eine wesentlich schwächere PFC-Aufnahme, was mit der Durchflusszytometrie und den endozytischen/phagozytischen Eigenschaften der Zellen in Einklang ist.

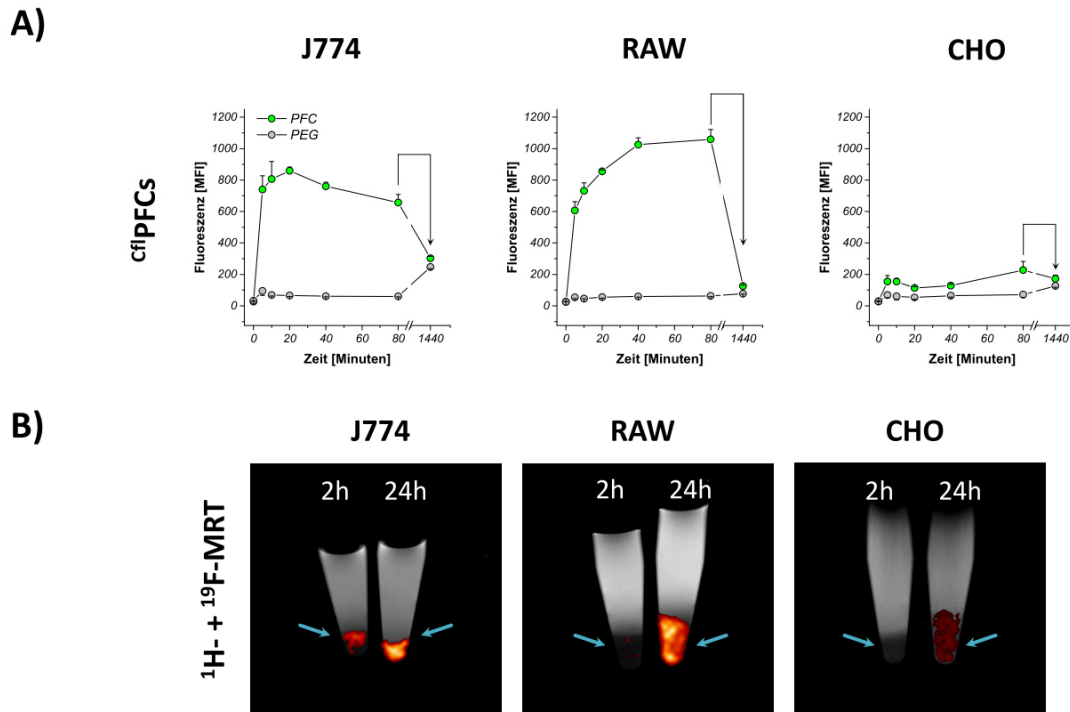


Abbildung II.7: Verhältnis von ^{19}F - und Fluoreszenzsignal *in vitro*: (A, B) Die Zelllinien J774, RAW und CHO wurden mit $^{\text{cf}}$ PFCs über 24 h inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Fluoreszenzsignal mittels Durchflusszytometrie (A, grün) bzw. ^1H -/ ^{19}F -MRT (B) ermittelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PEGylierten PFCs inkubiert, was die zelluläre Aufnahme nahezu komplett inhibiert. Abbildung angepasst nach Bouvain *et al.* (2018) [OA3].

Dissoziation des Fluoreszenz und des ^{19}F -Signals *in vivo*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es nach der zellulären Aufnahme von PFCs auch *in vivo* über einen längeren Zeitraum zu einem Verlust des Fluoreszenzsignals kommt. Da sich das Fluoreszenzsignal der $^{\text{cf}}$ PFCs als instabil erwies (s. II.7A und OA3), wurden für *in vivo* Versuche nur $^{\text{Rho}}$ PFCs eingesetzt. Da ein Großteil der intravenös injizierten PFCs in Milz und Leber akkumuliert, wurden diese Organe dazu genutzt, um den Verlauf des ^{19}F - und Fluoreszenzsignals *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurden PFCs intravenös injiziert, und zu verschiedenen Zeitpunkten (0.5 h; 2 h; 24 h) wurden Milz und Leber entnommen, um das Fluoreszenz- und das ^{19}F -Signal zu bestimmen.

Die quantitative Analyse der Leber zeigte eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals von 0.5 h bis 24 h (II.8, rote Punkte), während das ^{19}F -Signal über diesen Zeitraum kontinuierlich angestiegen ist (II.8, graue Punkte). Der Verlauf des ^{19}F - bzw. des Rhodamin-Signals für die Milz erscheint komplexer,

II Ergebnisse und Diskussion

wobei auch hier eine Verringerung des Fluoreszenzsignals zu sehen ist, während das ^{19}F -Signal über die Zeit stärker wird. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen wir auch bei der Analyse von Immunzellen des Blutes sowie von inflammatorischen „Hot Spots“ im Matrigel/LPS System [s. OA3].

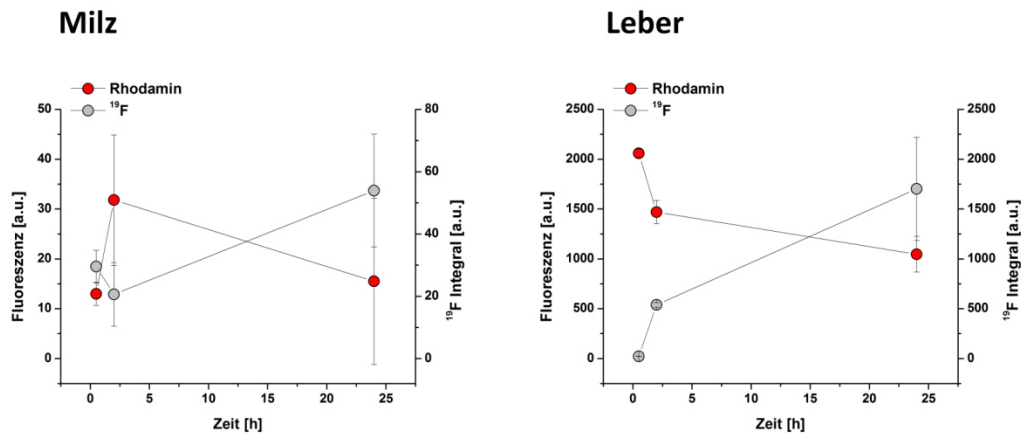


Abbildung II.8: Verhältnis von ^{19}F - und Fluoreszenzsignal *in vivo*: Verlauf des ^{19}F - (grau) und des Rhodaminsignals (rot) in Milz und Leber über die Zeit nach i.v. Injektion von $^{\text{Rho}}$ PFCs. Abbildung adaptiert nach Bouvain *et al.* (2018) [OA3].

Um die zellulären Mechanismen näher aufzuklären, die für den Verlust des Fluoreszenzsignals über die Zeit verantwortlich sind, haben wir versucht die Bedingungen innerhalb des endosomalen Systems von Zellen zu simulieren. Dazu wurden PFCs unterschiedlichen Arten von oxidativem Stress und verschiedenen pH-Werten ausgesetzt. Zunächst wurden $^{\text{Cfl}}$ PFCs und $^{\text{Rho}}$ PFCs mit H_2O_2 inkubiert und der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals bestimmt. Es konnte ein starker Verlust des Cfl-Signals bis auf ca. 25 % des Ausgangswertes beobachtet werden, wohingegen das Fluoreszenzsignal von $^{\text{Rho}}$ PFCs unverändert blieb. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich, wenn $^{\text{Rho}}$ PFCs bzw. $^{\text{Cfl}}$ PFCs mit Puffern verschiedener pH-Werte inkubiert wurden. Während das Cfl-Signal bei niedrigen pH-Werten deutlich abgeschwächt wurde, hatte der pH-Wert keinen Einfluss auf das Rhodamin-Signal der PFCs. Um zu überprüfen, ob auch zelluläre Enzyme die Fluorochrome angreifen können, haben wir $^{\text{Rho}}$ PFCs und $^{\text{Cfl}}$ PFCs mit Lysat aus J774 und RAW inkubiert, konnten jedoch keine Reduktion des Cfl/Rho-Signals nachweisen.

Ein Grund für die größere Empfindlichkeit der $^{\text{Cfl}}$ PFCs gegenüber oxidativem Stress und niedrigem pH sind die OH- bzw. die Carbonylgruppe, welche beim Rhodamin durch Methylgruppen ersetzt sind (s. Abb. II.6). Diese können oxidiert bzw. je nach pH-Wert deprotoniert oder protoniert werden, was das π -Elektronensystem der Ringstruktur beeinflusst. Die genauen zellulären Mechanismen, die zum Verlust des Fluoreszenzsignals der $^{\text{Rho/Cfl}}$ PFCs führen, sind noch unklar. Es ist jedoch denkbar, dass sich diese je nach Fluorochrom und Zelltyp unterscheiden können. Immunzellen beispielsweise können große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies produzieren, wohingegen bei Hepatozyten Enzyme des

P450-Systems Fluorochrome angreifen können. Der Verlust des Fluoreszenzsignals der PFCs ist dabei insbesondere für Langzeitstudien zum Zelltracking von Relevanz, da über längere Zeiträume keine direkte Korrelation zwischen ^{19}F - und dem Fluoreszenzsignal besteht.

II.2 Aktives Targeting von PFCs

Um die ^{19}F -MR-Bildgebung dazu nutzen zu können, gezielt bestimmte Strukturen oder Immunzelltypen darzustellen, die aufgrund geringer endogener Phagozytosekapazität nicht mit PFCs markiert werden, wird ein aktives Targeting der PFCs benötigt. Hierbei verwendet man spezifische Liganden, die an die Nanopartikel-Oberfläche gekoppelt werden und eine direkte und spezifische Interaktion der Nanopartikel mit der Struktur oder Zelloberfläche vermitteln. Um die Spezifität des Targetings zu verbessern, soll über entsprechende Oberflächenmodifikation der Partikel die Aufnahme durch phagozytische Immunzellen unterbunden werden.

Die prinzipielle Machbarkeit eines aktiven Targetings von PFCs wird anhand von zwei Originalarbeiten zur Darstellung von tiefen venösen Thromben [OA4] und der Markierung von Zellen über ein synthetisches Cargo-Internalisierungs-Rezeptorsystem (CIR) [OA5] vorgestellt.

II.2.1 Darstellung von venösen Thromben mittels aktivem Targeting und ^1H -/ ^{19}F -MRT

Thromben können nichtinvasiv durch Ultraschall¹¹⁷, Computertomographie¹¹⁸ oder MRT visualisiert werden¹¹⁹. Jedoch ist die Detektion von Thromben mittels MRT durch MR-Angiographie oder T1/T2-gewichtete MRT oft schwierig, da v.a. kleine Thromben nur einen geringen Einfluss auf den Blutfluss haben und sich auch in stark gewichteten MRT-Aufnahmen vom umliegenden Gewebe oft nicht eindeutig abgrenzen lassen. Um die Visualisierung von Thromben zu verbessern, wurden daher in der Vergangenheit Kontrastmittel entwickelt, welche an Fibrin oder an Plättchen binden (z.B. EP-2104R)^{65–68,120–122}. Ein weiterer Marker insbesondere für frühe Thromben ist die aktivierte Form des Gerinnungsfaktors XIII (FXIIIa). FXIIIa ist eine Transglutaminase, welche die α - und γ -Untereinheiten des Fibrins quervernetzt¹²³, aber auch eine Reihe weiterer Plasmaproteine (wie z.B. das α 2-Antiplasmin) in dem Fibrinnetz fixiert. Um die prinzipielle Machbarkeit einer nichtinvasiven Darstellung von frühen Thromben über ^{19}F -MRT zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein vom α 2-Antiplasmin abgeleitetes Peptid ($\alpha 2^{\text{AP}}$) eingesetzt, für das bereits beschrieben wurde, dass es spezifisch in frühen Thromben akkumuliert^{124–127}.

Herstellung von $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs durch Sterol-basierte Post-Insertion

Für das Targeting von PFCs an frühe Thromben wurde ein 14 Aminosäuren langes Peptid aus dem α 2-Antiplasmin verwendet ($\alpha 2^{\text{AP}}$) (Abb. II.9A), bei dem der Glutaminsäurerest Q3 über die aktivierte Form des Gerinnungsfaktors XIIIa mit dem Fibrinsystem des Thrombus' quervernetzt wird. Zur Modifikation der PFC-Oberfläche mit $\alpha 2^{\text{AP}}$ wurde die sog. Sterol-basierte Post-Insertionstechnik (SPIT) eingesetzt,

die eine Funktionalisierung von PFCs unter milden Reaktionsbedingungen ermöglicht^b. Die Bindung vom $\alpha 2^{\text{AP}}$ an einen Cholesterolanker erfolgte über die Reaktion der SH-Gruppe eines Cysteins am Lysinrest K13 des $\alpha 2^{\text{AP}}$ mit der Maleimidgruppe am distalen Ende eines Cholesterol-PEG₂₀₀₀-Maleimids (s. Abb. II.9, links). Im zweiten Schritt wurde das Chol-PEG₂₀₀₀- $\alpha 2^{\text{AP}}$ -Konjugat mit vorgefertigten PFCs inkubiert, wodurch es zur spontanen Einlagerung des Cholesterols in die Lipidhülle kommt. Als Kontrolle wurden PFCs mit einem Peptid modifiziert, bei dem die Aminosäure Q3 gegen Alanin ausgetauscht wurde (Q3A-PFCs). Dieses Q3A-Peptid wird um ein Vielfaches schlechter von FXIIIa mit dem Fibrinnetz verbunden^c.

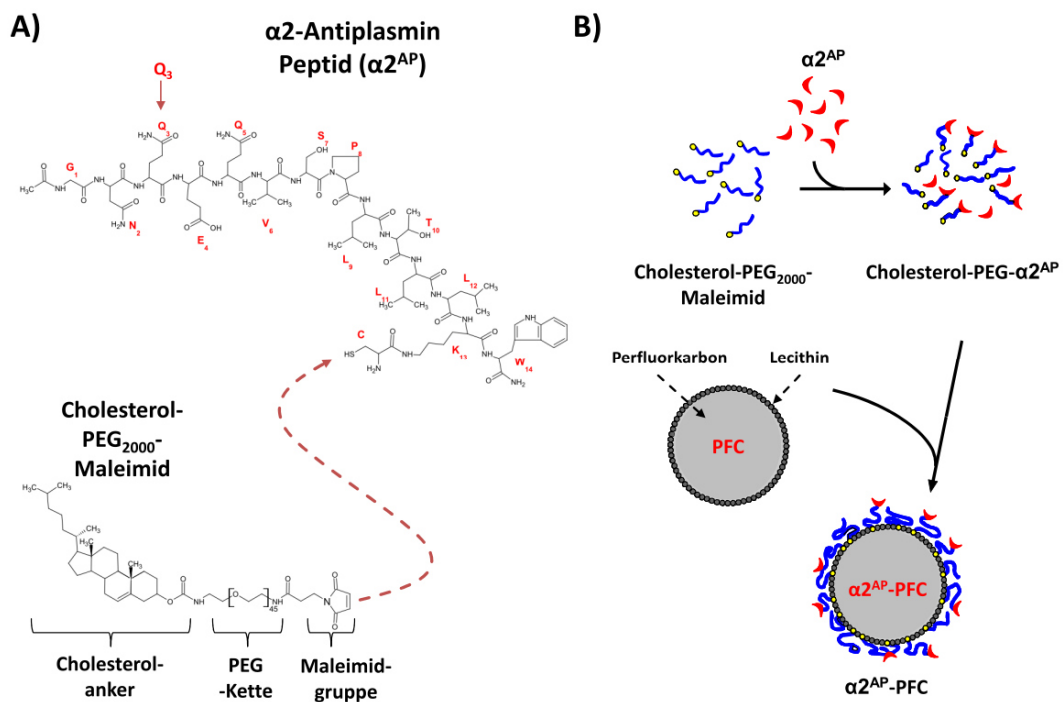


Abbildung II.9: Herstellung von $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs: (A) Schematische Struktur des Cholesterol-PEG₂₀₀₀-Maleimids und des $\alpha 2^{\text{AP}}$ -Antiplasmin Peptids. (B) Herstellung von $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs über Sterol-basierte Post-Insertion (SPIT). Abbildung modifiziert nach Temme *et al.* (2015) [OA4].

Detektion von tiefen venösen Thromben in der unteren Hohlvene der Maus

Um zu überprüfen, ob $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs dazu geeignet sind, Thromben *in vivo* durch ¹⁹F-MRT zu detektieren, haben wir ein FeCl₃-Modell zur Erzeugung von tiefen venösen Thromben in der Maus eingesetzt. Hierbei wird Filterpapier, welches mit Eisen-III-Chlorid-Lösung (10%) getränkt ist, von außen auf das Gefäß aufgelegt, wodurch es zu einer Gefäßverletzung und innerhalb kurzer Zeit zur Bildung eines Thrombus kommt¹²⁹. Da FXIIIa nur in der frühen Phase der Thrombusbildung aktiv ist, wurden die PFCs

^b PFCs werden gewöhnlich durch Hochdruckhomogenisation bei 1000 bar hergestellt. Hierbei kann es lokal zu hohen Temperaturen kommen, die labile Liganden zerstören können¹²⁸.

^c Auch über den Glutaminsäurerest Q5 kann $\alpha 2^{\text{AP}}$ mit dem Fibrinnetz über FXIIIa quervernetzt werden. Allerdings erfolgt dies mit deutlich geringerer Effizienz.

II Ergebnisse und Diskussion

ca. 5 min vor der Thrombus-Induktion intravenös appliziert und die ^1H -/ ^{19}F -Messungen erfolgten innerhalb von 2 – 24 h. In Abbildung II.10A sind anatomische ^1H -MRT-Schnittbilder durch den Bauchraum der Maus auf der Höhe der Nieren dargestellt (links). Die korrespondierende ^{19}F -Messung (Mitte) zeigt nur ein einziges punktförmiges Signal, welches sich exakt an der Stelle des induzierten Thrombus^d befindet (s. Vergrößerung im unteren Bildteil). Demgegenüber resultierte die Applikation der Q3A-PFCs in einem erheblich schwächeren ^{19}F -Signal. Um sicherzustellen, dass dieses im Thrombus lokalisiert ist, wurden hochaufgelöste *ex vivo* ^1H -/ ^{19}F -Messungen und histologische Untersuchungen durchgeführt (Abb. II.10B-D). Über Hämatoxylin/Eosin- sowie Sirius-Rot-Färbungen wurde die Bildung von Thromben innerhalb der unteren Hohlvene verifiziert. Hochaufgelöste *ex vivo* MRT-Messungen zeigten einen inhomogenen ^1H -Kontrast des Thrombus^d, welcher durch eingelagerte Erythrozyten bedingt sein kann^d. Die ^{19}F -Messungen belegen, dass das ^{19}F -Signal eindeutig innerhalb des Thrombus^d vorliegt und ebenfalls ein fleckenartiges Muster aufweist. Diese Befunde wurden durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie validiert, wobei Carboxyfluorescein-markiertes $\alpha 2^{\text{AP}}$ (bzw. Q3A) eingesetzt wurde (II.10D). Auch hierbei zeigte sich im Falle der $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs ein fleckenartiges Muster des Fluoreszenzsignals, während für Q3A-PFCs nur Hintergrundfluoreszenz detektiert werden konnte.

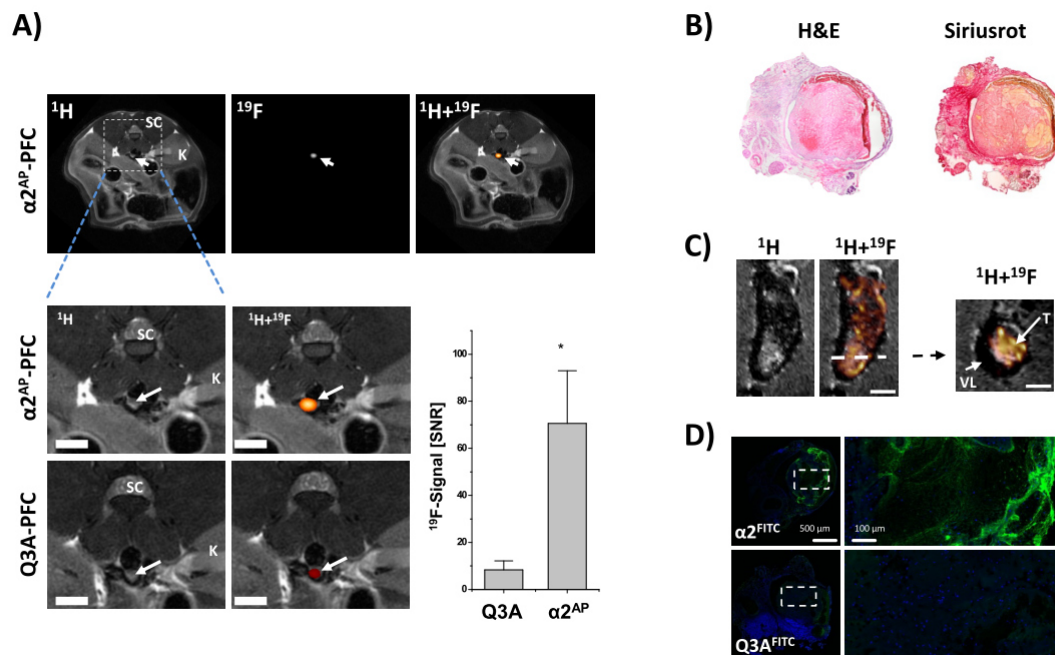


Abbildung II.10: Spezifische Detektion von frühen Thromben mittels ^{19}F -MRT: (A) *In vivo* ^1H -/ ^{19}F -MRT-Messungen von FeCl_3 -induzierten Thromben in der unteren Hohlvene nach i.v. Injektion von $\alpha 2^{\text{AP}}$ - bzw. Q3A-PFCs. SC = Spinal Cord $\triangleq$ Rückenmark. (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (links) und Sirius-Rot-Färbung (rechts). (C) Überlagerung hochaufgelöster ^1H -/ ^{19}F -Messungen (0.5 nL Voxelgröße) eines Thrombus^d der unteren Hohlvene. T = Thrombus; VL = Vessel lumen $\triangleq$ Gefäßinnenraum. (D) Fluoreszenzmikroskopie von Thromben nach Injektion von Carboxyfluorescein-markierten $\alpha 2^{\text{AP}}$ -/Q3A-PFCs. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Abbildung modifiziert nach Temme *et al.* (2015) [OA4].

^d Der Thrombus befindet sich im Gefäßlumen (dunkel), welches von Agarose (hell) umgeben ist.

PEGylierung der PFCs reduziert die Aufnahme durch Monozyten

Die Erzeugung von Thromben in der unteren Hohlvene ist mit einem erheblichen operativen Eingriff im Bauchraum verbunden. Daher war überraschend, dass bis auf das ^{19}F -Signal im Thrombus kaum ^{19}F -Akkumulation im Operationsbereich detektiert wurde. Die Oberfläche der $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs enthält neben dem Targetingpeptid auch PEG₂₀₀₀-Ketten, von denen bekannt ist, dass sie die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln erheblich reduzieren. Aus diesem Grund haben wir vermutet, dass die PEGylierung der PFC-Partikeloberfläche die Akkumulation von PFCs im Entzündungsbereich reduziert. Um dies zu überprüfen, wurden herkömmliche PFCs und PEGylierte PFCs (ohne Targetingpeptid) 5 min vor der Thrombus-Induktion i.v. injiziert und anschließend ^1H -/ ^{19}F -MRT-Messungen über den Bereich der Operationsstelle durchgeführt. Wie erwartet konnten wir nach Applikation von herkömmlichen PFCs starke ^{19}F -Signale im Bauchraum finden (II.11A, gelbe Pfeile), welche durch die Entzündungsreaktion aufgrund des operativen Eingriffs hervorgerufen wurden. Im Gegensatz dazu konnten nach Injektion von PEGylierten PFCs kaum ^{19}F -Signale in diesem Bereich detektiert werden (II.11A). Dies untermauert, dass eine PEGylierung der PFCs die unspezifische Anreicherung im Bauchraum erheblich vermindert. Zudem konnten weder bei PFCs, noch bei PEG-PFCs ^{19}F -Hot Spots im Bereich des Thrombus' detektiert werden (weiße Pfeile).

Um die Mechanismen aufzuklären, die hinter diesem ^{19}F -Verteilungsmuster liegen, wurde (i) die Immunzellzusammensetzung der Thromben durchflusszytometrisch analysiert und (ii) in separaten Experimenten die Aufnahme von PFCs und PEG-PFCs in Monozyten untersucht (II.11B,C). Hierbei zeigte sich, dass in den Thromben nur eine geringe Anzahl an Immunzellen (insbesondere neutrophile Granulozyten) vorhanden waren. Ferner konnten wir zeigen, dass PEGylierte PFCs erheblich schlechter in Monozyten aufgenommen werden. Untersuchungen zur Blut-Halbwertszeit von PFCs und PEG-PFCs zeigten zudem, dass die Halbwertszeit von PEGylierten PFCs im Blut wesentlich kürzer als die von herkömmlichen PFCs ist (~2h PEG-PFCs vs. ~24h PFCs; II.11C). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass PEGylierte PFCs in geringerem Ausmaß von Immunzellen im Blut aufgenommen werden, dadurch stärker in Milz und Leber akkumulieren und schneller aus dem Blutstrom entfernt werden.

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Kombination aus spezifischem Targetingligand, reduzierter Aufnahme durch Immunzellen und erheblich verkürzter Blut-Halbwertszeit die Grundlage für die hohe Spezifität des Thrombus-Targetings über $\alpha 2^{\text{AP}}$ -PFCs darstellt.

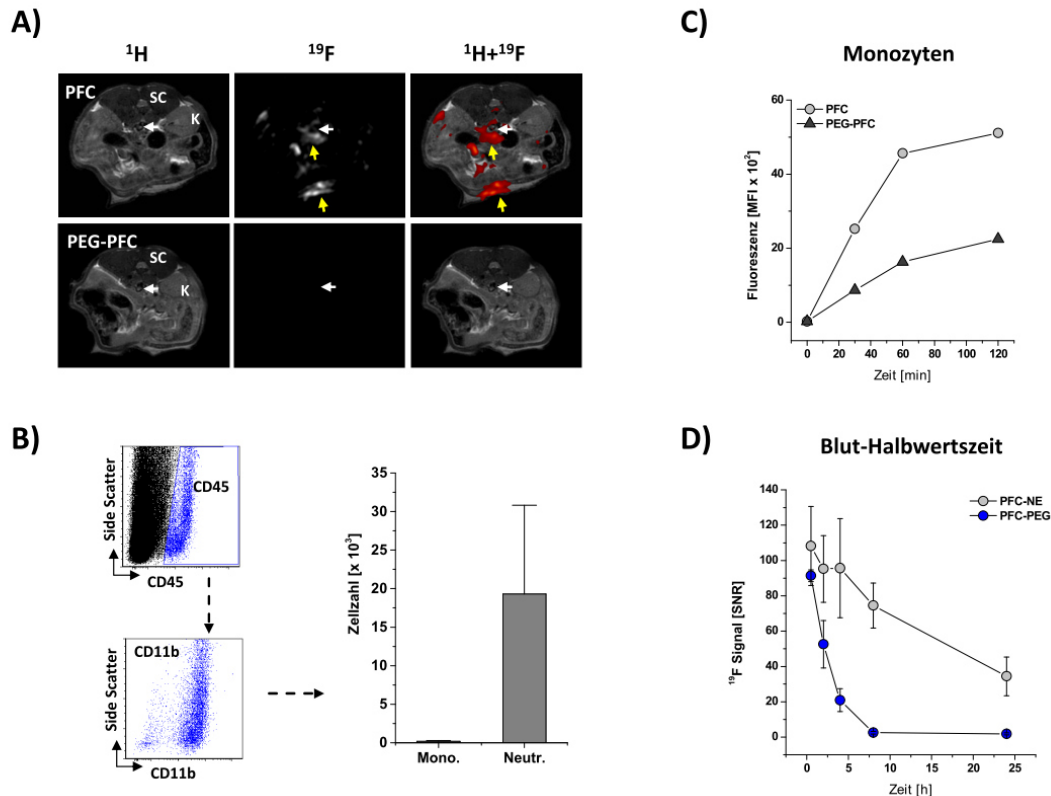


Abbildung II.11: Vergleich von PFCs und PEGylierten PFCs: (A) ^1H -/ ^{19}F -MRT des Bauchraumes von Mäusen, denen vor der Thrombus-Induktion PFCs (oben) bzw. PEGylierte PFCs (unten) intravenös appliziert wurden. Die weißen Pfeile zeigen die Lokalisation des Thrombus' an. Gelbe Punkte markieren das ^{19}F -Signal im Entzündungsherd, welcher durch den operativen Eingriff verursacht wurde. (B) Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung von venösen Thromben. (C) Zelluläre Aufnahme von PFCs und PEGylierten PFCs durch humane Monozyten. (D) Über ^1H -/ ^{19}F -MRT ermittelte Blut-Halbwertszeit der PFCs. Abbildung modifiziert nach Temme *et al.* (2015) [OA4].

II.2.2 Aktives Targeting von Zellen durch ein synthetisches Cargo-Internalisierungssystem

Nachdem im obigen Abschnitt die prinzipielle Machbarkeit eines aktiven Targetings für PFCs gezeigt werden konnte, sollten im nächsten Schritt spezifische Zelltypen über ein aktives Targeting von PFCs angesteuert werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Scheller (Biochemie, HHU Düsseldorf) wurde daher ein Targeting-System entwickelt, welches auf synthetischen Cargo-Internalisierungs-Rezeptoren (CIR) basiert. Diese Rezeptoren enthalten einen Nanobody, der hochspezifisch für GFP (green fluorescent protein) ist und über welchen GFP bzw. GFP-markierte Nanopartikel (z.B. GFP-PFCs) an der Zelloberfläche gebunden und internalisiert werden können (siehe Abb. II.12).

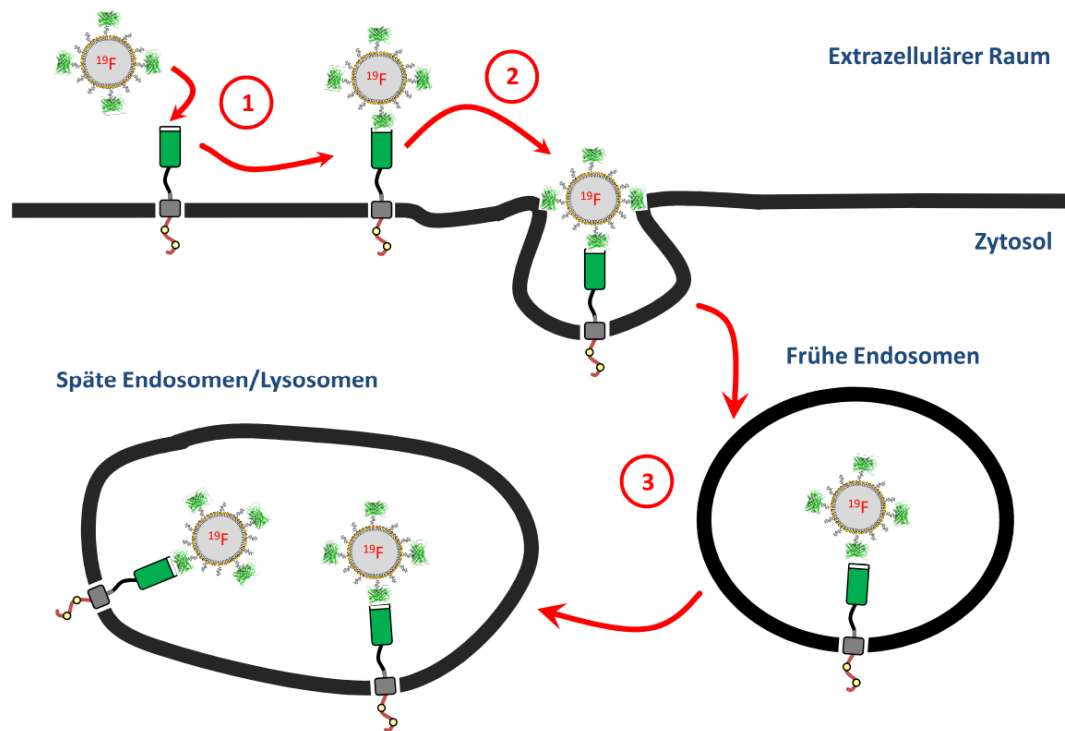


Abbildung II.12: Schematische Darstellung zur Funktionsweise der Cargo-Internalisierungs-Rezeptoren (CIRs): CIRs werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie über die Sequenz eines GFP-Nanobodies GFP bzw. GFP-Cargo binden können (1). Diese Komplexe werden anschließend internalisiert (2) und akkumulieren im endosomalen System, was die Anreicherung des Kontrastmittels innerhalb der Zellen gewährleistet (3). Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2018) [OA5].

Herstellung und Charakterisierung von CIRs

Bei den eingesetzten CIRs handelt es sich um Typ-1-Transmembranproteine, die aus einem N-terminalen myc-Tag, einem GFP-Nanobody (GFP-Nb), einer Linker-Region und unterschiedlichen Transmembran- (TM) sowie zytoplasmatischen Bereichen aufgebaut sind. Insgesamt wurden drei CIRs (CIR1, CIR2, CIR3 – s. II.13A) entwickelt, die sich in ihren zytoplasmatischen Domänen (CTD) unterscheiden. CIR1 enthält die TM/CTD aus dem IL6-Rezeptor, CIR2 besitzt die CTD von Endo180 – einem Mitglied der Mannose-Rezeptor-Familie und CIR3 die TM/CTD aus dem phagozytischen Rezeptor FcγRIIA. Während die CTD des CIR1 keine klassischen Internalisationsmotive besitzt¹³⁰, enthält die CTD des CIR2 ein Tyrosin-basiertes bzw. di-hydrophobes Signal, was für die schnelle Internalisierung von Endo180 verantwortlich ist^{131,132}. Innerhalb der Sequenz der CTD von CIR3 finden sich zwei sog. ITAMs, die für die phagozytischen Eigenschaften des FcγRII essentiell sind^{133,134}.

Da die Bindung des GFP-Cargo an der Zelloberfläche erfolgt, haben wir zunächst die Oberflächenexpression der CIRs und anschließend die Bindung und Endozytose von GFP untersucht. Mittels durchflusszytometrischen Analysen konnten wir zeigen, dass alle CIRs an der Zelloberfläche

II Ergebnisse und Diskussion

exprimiert werden und GFP binden können. In CIR-negativen Kontrollzellen konnte keine Bindung von GFP nachgewiesen werden (Abb. II.13B; grüne Histogramme). Im nächsten Schritt wurde die Internalisierung von GFP überprüft. Zu diesem Zweck wurden transient transfizierte COS-7-Zellen zunächst bei 4 °C mit GFP inkubiert, was die Bindung an die Zelloberfläche ermöglicht, aber nicht zur zellulären Aufnahme des GFP-Cargo führt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen auf 37 °C erwärmt, um die Endozytose des GFP zu ermöglichen. Während die Inkubation bei 4 °C zu einer relativ gleichmäßigen Verteilung des GFP über die Zelloberfläche führt, lassen sich bei 37 °C deutliche vesikuläre GFP-Signale innerhalb der Zelle erkennen (s. Abb. II.13C).

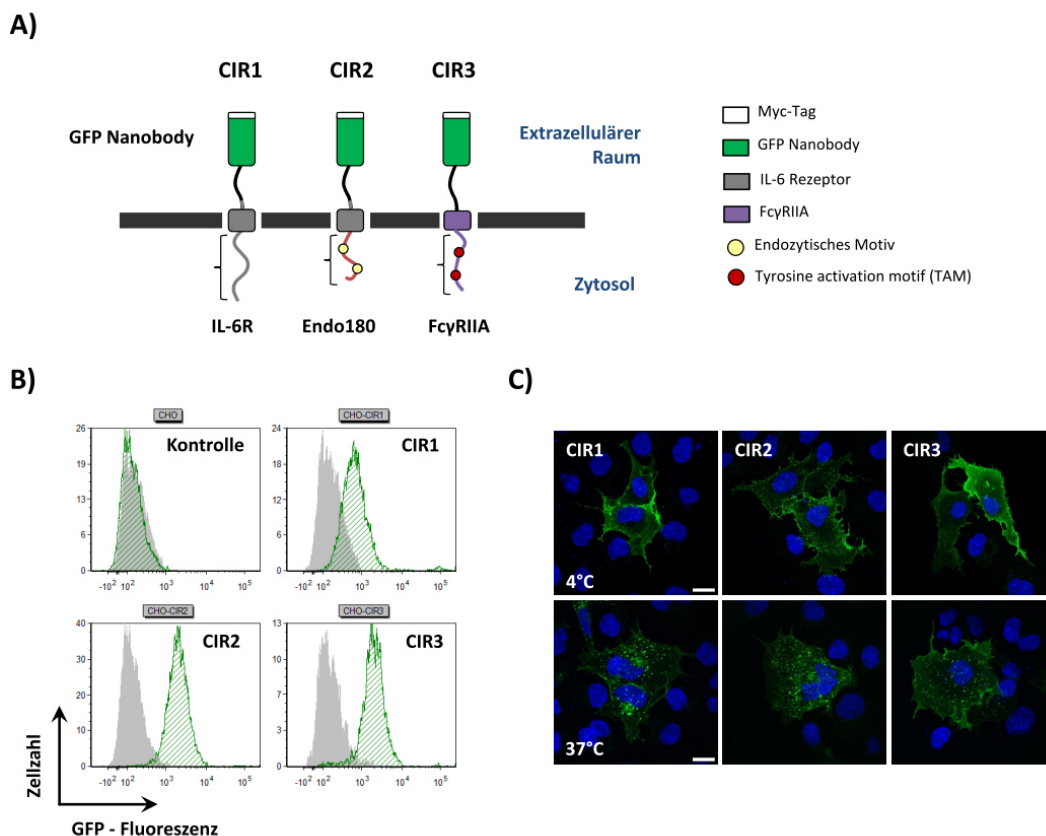


Abbildung II.13: CIR-vermittelte Bindung/Internalisierung von GFP (A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Cargo-Internalisierungs-Rezeptoren (CIRs). (B) Bindung von GFP an die Zelloberfläche CIR1-3-exprimierender CHO-Zellen. Kontrolle = CHO ohne CIR. Grün = Inkubation mit GFP; Grau = Kontrolle ohne GFP. (C) CIR-vermittelte Endozytose von GFP. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden zunächst bei 4 °C mit GFP inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend fixiert (obere Reihe, 4 °C), der zweite Teil der Zellen wurde bei 37 °C weiterbehandelt, um die zelluläre Aufnahme des GFP zu ermöglichen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab = 10 µm. Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2018) [OA5].

¹⁹F-MRT von CIR-exprimierenden Zellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Expression der CIRs auch zu einer zellulären Aufnahme von GFP-PFCs und damit zu einem nachweisbaren ¹⁹F-Signal in CIR-exprimierenden Zellen (CIR⁺-Zellen) führt. Zur Kopplung von GFP an die Partikeloberfläche der PFCs wurde das GFP thioliert,

was zur Funktionalisierung von Lysinresten mit freien –SH Gruppen führt (GFP-SH). Anschließend wurde GFP-SH mit vorgefertigten Maleimid-PFCs (Mal-PFCs) umgesetzt^e. Durch die Reaktion der –SH-Gruppen des GFP mit dem Maleimidrest kommt es zur Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung und somit zu einer Kopplung des GFP an die PFC-Partikeloberfläche.

Um die Aufnahme von GFP-PFCs in Zellen zu untersuchen, wurden stabil oder transient transfizierte CIR⁺-Zellen mit GFP-PFCs inkubiert und anschließend über einen Percoll-Gradienten aufgetrennt. Hierbei reichern sich die Zellen in einer engen Zellschicht oberhalb des Percolls an. Freie PFCs verbleiben jedoch oberhalb der Zellschicht, wodurch die ¹⁹F-Signale von zellinternalisierten und freien PFCs eindeutig voneinander getrennt werden können^{90,91}. In Abb. II.14A sind in der linken Spalte Fotos von Percollgradienten dargestellt, bei denen die Zellschicht als dünne weiße Linie zu erkennen ist. Rechts daneben befinden sich T2-gewichtete ¹H-MRT-Aufnahmen, in denen sich die Zellen als dunkle dünne Linie darstellen. In der rechten Spalte der Abb. II.14A sind die korrespondierenden ¹⁹F-Bilder und Überlagerungen der ¹H- und der ¹⁹F-Bilder gezeigt. Man erkennt deutlich, dass in den CHO-Zellen nur ein sehr geringes ¹⁹F-Signal zu erkennen ist, welches in den CHO-CIR1 ein wenig stärker ist. Demgegenüber sind in CIR2⁺- und CIR3⁺- Zellen sehr starke ¹⁹F-Anreicherungen zu erkennen. Die Quantifizierung der ¹⁹F-Signale ist in Abb. II.13B dargestellt. Diese Versuche wurden auch mit transient transfizierten Zellen und der Suspensionszelllinie Ba/F3 bzw. mit Ba/F3-CIR3 durchgeführt. Auch hierbei konnten wir insbesondere in den CIR2/3-transfizierten Zellen ein stärkeres ¹⁹F-Signal als in Kontrollzellen feststellen. Dies ist insofern bemerkenswert, da im Falle der transient transfizierten Zellen nur ca. 10-30 % der Zellen den Rezeptor in stark unterschiedlicher Menge exprimieren.

Bei einem Transfer dieses Systems in eine *in vivo* Umgebung konkurrieren CIR⁺-Zellen mit phagozytischen Immunzellen im Blut und am Entzündungsherd um die Aufnahme des GFP-Cargo. Um zu testen, ob das CIR-System auch unter diesen Bedingungen zu einer spezifischen Aufnahme in CIR⁺-Zellen führt, wurden Kokulturrexperimente mit Immunzellen aus dem Blut (s. Abb. II.14C) und mit aktivierten neutrophilen Granulozyten durchgeführt (s. OA5). Hierbei konnten wir zeigen, dass CIR⁺-Zellen eine vielfach stärkere GFP/GFP-PFC Aufnahme aufweisen als CD11b⁺-Immunzellen des Blutes (s. Abb II.14C) und aktivierte neutrophile Granulozyten [s. OA5]. Der Hauptgrund für die hohe Spezifität der GFP-PFCs für CIR⁺-Zellen liegt sehr wahrscheinlich wiederum in der PEGylierung der GFP-PFC Partikeloberfläche, welche die zelluläre Aufnahme durch Immunzellen deutlich reduziert (s.o.).

Um zu überprüfen, ob die Ansteuerung zellulärer Oberflächenrezeptoren durch GFP-PFCs zu einer Modulierung der Zelleigenschaften führt, wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob es durch die Bindung/Internalisation von GFP-PFCs zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen kommt.

^e Zur Herstellung von Mal-PFCs wurde DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimid während des Herstellungsprozesses hinzugefügt und somit in die Lipidoberfläche der Partikel inseriert. Um eine Hydrolyse des Maleimids zu verhindern, wurden diese PFCs bei -80°C gelagert.

II Ergebnisse und Diskussion

Anhand eines „Whole Genome“ Microarrays zeigte sich, dass die Interaktion von CIRs mit GFP-PFCs keine signifikante Hochregulation von Genen verursacht [s. OA5].

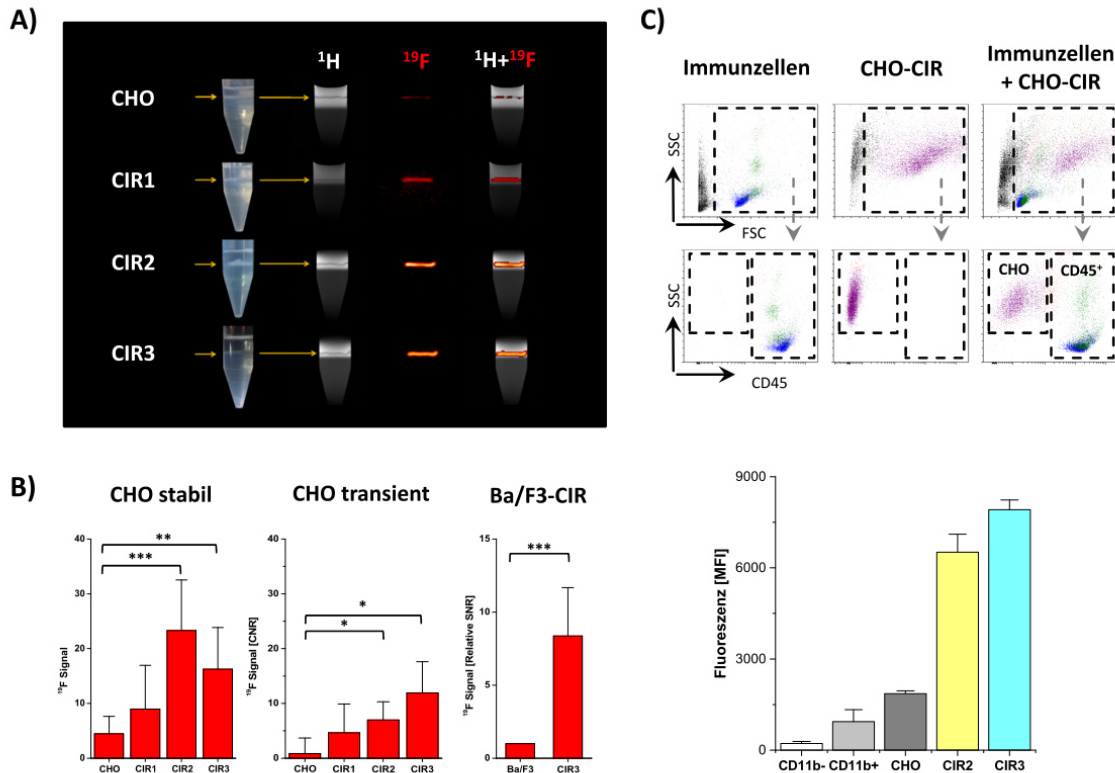


Abbildung II.14: ^{19}F -MRT von CIR $^{+}$ - Zellen: (A) CHO-CIR-Zellen wurden mit GFP-PFCs inkubiert, gewaschen und über einen Percollgradienten aufgetrennt. Links sind Fotos der Gradienten dargestellt. Daneben befindet sich die entsprechende T2-gewichtete ^1H -MRT-Aufnahme, in der die Zellen als dunkle Linie zu erkennen sind (Pfeil). In der dritten und vierten Spur sind entsprechende ^{19}F -Bilder und ^1H - ^{19}F -Überlagerungen gezeigt. (B) Quantifizierung des ^{19}F -Signals in stabilen CHO-CIR-Zellen (Links), in transient transfizierten CHO-Zellen (Mitte) und Ba/F3- bzw. Ba/F3-CIR3-Zellen (Rechts). (C) Kokultur von CHO-CIR-Zellen mit murinen Blut-Immunzellen. Oben: Unterscheidung von CHO-CIR-Zellen anhand des FSC-/SSC-Signals und der CD45-Färbung von Immunzellen. Unten: Quantitative Analyse der GFP-PFC-Aufnahme durch CHO-CIR und durch murine Immunzellen. Abbildung verändert nach Temme *et al.* (2018) [OA5].

II.3 Darstellung von PFCs mit komplexen ^{19}F -Spektren

In bisherigen Studien wurden für die ^{19}F -MRT zumeist PFC-Emulsionen eingesetzt, die PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) als ^{19}F -Quelle enthielten, der eine sehr lange biologische Halbwertszeit besitzt. Dies hat zwar Vorteile in Tierexperimenten, in denen über einen längeren Zeitraum Zellen verfolgt werden sollen, macht aber repetitive Messungen schwierig. Neben PFCE gibt es aber auch Perfluorkarbone mit kurzen biologischen Halbwertszeiten, zu denen das Perfluoroktylbromid (PFOB), das Perfluordekalin (PFD) oder das F-44E (Trans-bis-perfluorobutylethylen) gehören. Im Gegensatz zum PFCE haben diese Substanzen jedoch eine geringere molekulare Symmetrie, was zu komplexen ^{19}F -Spektren führt. Da dies bei konventioneller ^{19}F -Bildgebung in „*Chemical Shift*“ Artefakten resultiert, sind zur korrekten Visualisierung dieser Verbindungen spezielle Methoden bzw. Anpassungen an bestehende MRT-Sequenzen nötig (s. Abb. II.15).

In diesem Abschnitt werden daher Arbeiten zur ^{19}F -MRT von PFCs mit komplexen Spektren durch *Chemical Shift Imaging* (CSI) [OA6] bzw. über die selektive Anregung isolierter ^{19}F -Resonanzen bei schmaler Bandbreite [OA7] vorgestellt.

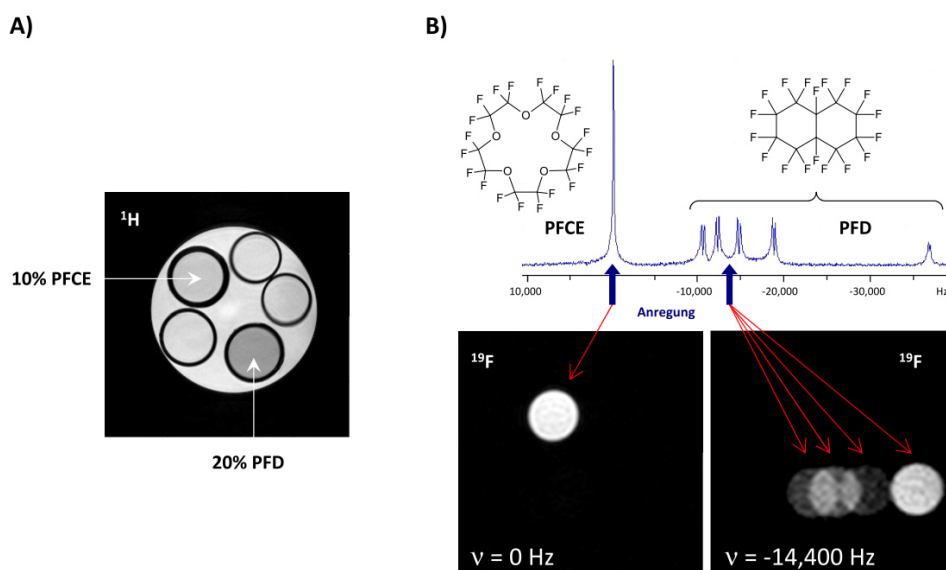


Abbildung II.15: Darstellung von PFCs mit magnetisch unterschiedlichen ^{19}F -Atomen: (A) ^1H -Referenzbild: Die weißen Pfeile markieren Eppendorf-Röhrchen, die 10 % PFCE-PFCs bzw. 20 % PFD-PFC enthalten. (B) ^{19}F -MR-Spektrum einer Mischung aus PFCE (einzelner Peak bei 0 Hz) und PFD (fünf Signalgruppen). Die blauen Pfeile stellen die Frequenzen der jeweiligen Anregungspulse dar. Aufgrund der großen chemischen Verschiebung der ^{19}F -Signale sind die Bilder des PFCE frei von Bildgebungsartefakten. Platziert man den Anregungspuls jedoch in die Mitte der PFD-Resonanzen, so kommt es aufgrund der Signalaufspaltung durch magnetisch unterschiedliche ^{19}F -Kerne bei der Rekonstruktion der Bilddaten zu erheblichen *Chemical Shift* Artefakten. Abbildung verändert nach Temme et al. (2012)¹⁰³.

II Ergebnisse und Diskussion

II.3.1 ^{19}F -MRT durch Chemical Shift Imaging (CSI)

In OA6 wurden für verschiedene PFCs (PFCE, PFOB, PFD, F-44E) die biologischen Halbwertszeiten in Milz und Leber, sowie deren Eignung zur Darstellung von Entzündungsprozessen nach intravenöser Injektion in Mäusen untersucht. Um PFCs mit komplexen ^{19}F -Spektren (PFOB, PFD, F44-E) artefaktfrei detektieren zu können, wurde das sog. *Chemical Shift Imaging* verwendet. Dabei handelt es sich um eine spektroskopische Methode, bei der voxelweise ^{19}F -Spektren aufgenommen werden. Diese können anhand einer speziell entwickelten Software in Bilddaten umgewandelt und qualitativ sowie quantitativ ausgewertet werden^f.

Auswaschkinetik von PFOB, PFD, F-44E und PFCE aus Milz und Leber

Zunächst wurde das ^{19}F -Signal der PFOB-, PFD- und F-44E-PFCs anhand der CSI-Methode mit PFCE-PFCs verglichen. Interessanterweise waren die ^{19}F -Integrale geringer als anhand der jeweiligen Molaritäten der Perfluorkarbonate erwartet wurde. So lag das ^{19}F -Signal der F-44E-PFCs nur um den Faktor 1.8 und von PFOB-PFCs um den Faktor 1.3 höher als das von PFCE, obwohl der ^{19}F -Gehalt um den Faktor 6-7 größer ist. Dies könnte sowohl darin begründet sein, dass es bei der Integration mehrerer Peaks während der Datenauswertung zu einem Intensitätsverlust durch einen höheren Anteil an Signalrauschen kommt, als auch in einem Verlust von Perfluorkarbonen beim Herstellungsprozess^g.

Im nächsten Schritt wurde die CSI-Technik dazu eingesetzt, die biologische Halbwertszeit der PFCs *in vivo* zu bestimmen. Hierzu wurden PFCs intravenös in Mäuse injiziert und repetitive Messungen der Milz und der Leber über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen durchgeführt. Exemplarische Überlagerungsbilder des anatomischen ^1H - und des ^{19}F -Signals (PFOB-PFCs) sind in Abb. II.16 dargestellt. Quantitative Analysen des ^{19}F -Gehalts dieser Organe zeigten, dass die Freisetzung von PFCE-PFCs aus Milz und Leber deutlich geringer als die der alternativen PFCs ist. Interessant ist jedoch auch, dass das Signal bei allen PFCs in der Leber deutlich schneller als in der Milz abfällt. Die genauen Gründe hierfür sind unklar, könnten aber durch eine stärkere Perfusion der Leber erklärt werden. Dies führt zu einer schnelleren Diffusion der Perfluorkarbonate in den Blutstrom und anschließender einer Abatmung über die Lunge.

^f Für nähere Informationen zur CSI-Sequenz und zur Bildgebungsmethodik siehe OA6.

^g Aufgrund des niedrigeren Dampfdrucks der alternativen PFCs (PFOB, PFD, PFBE) gegenüber dem PFCE und der hohen Temperaturen beim Herstellungsprozess könnte es zum verstärkten Übergang der PFCs in die Gasphase kommen.

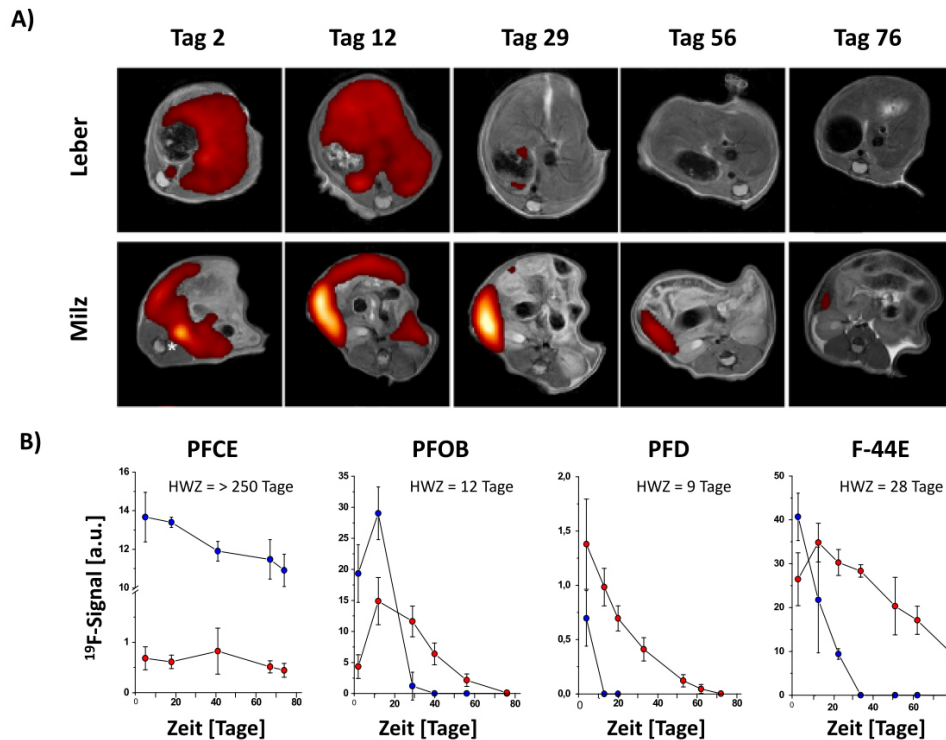


Abbildung II.16: Zeitverlauf des ^{19}F -Signals in Milz und Leber: (A) Exemplarische ^1H -/ ^{19}F -Überlagerungsbilder von Milz und Leber nach Applikation von PFOB-PFCs. An Tag zwei nach Injektion der PFCs kann noch ^{19}F -Signal in der abdominalen Aorta bzw. der unteren Hohlvene (untere Reihe; Stern), sowie in den Blutgefäßen der stark durchbluteten Nieren detektiert werden. (B) Quantitative Analyse des ^{19}F -Gehalts in Leber und Milz über einen Zeitraum von 80 Tagen. F-44E = Trans-bis-perfluorbutylethylen; PFCE = Perfluor-15-kronen-5-ether; PFD = Perfluordekalin; PFOB = Perfluoroktylbromid. Blau = Leber, Rot = Milz; HWZ = Biologische Halbwertszeit. Abbildung modifiziert nach Jacoby *et al.* (2014) [OA6].

Bildgebung des Entzündungsprozesses nach Ohrloch-Markierung

Um die Empfindlichkeit der CSI-Methode zur Detektion entzündlicher Prozesse zu untersuchen, wurde ein einfaches Entzündungsmodell gewählt, bei dem das Ohr einer Maus mit einer Ohrstanze markiert wurde. 24 h nach der Markierung wurden PFCs intravenös verabreicht und anschließend erfolgten repetitive ^1H - und ^{19}F -2D-CSI-Messungen über einen Zeitraum von 80 Tagen. Die anatomischen ^1H -Bilder zeigen deutlich die Markierung in der Mitte des Ohres und nach Applikation von PFCE-, PFOB- und F-44E-PFCs sind starke ^{19}F -Signale in der Nähe der Ohrmarkierung zu beobachten. Interessanterweise befindet sich das ^{19}F -Signal hauptsächlich an der körpernahen Seite der Verletzung. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Entzündungsreaktion um die Markierung herum nicht gleichmäßig verläuft, was auch mit der stärkeren Schwellung des Ohres auf dieser Seite übereinstimmt. Für PFD-PFCs konnte nur nach Langzeitmessungen ($\sim 12\text{h}$) ^{19}F -Signal im Ohr nachgewiesen werden.

II Ergebnisse und Diskussion

Die quantitativen Analysen der Zeitverläufe des ^{19}F -Signals im Bereich der Ohrmarkierung zeigen, dass die Injektion von PFCE-PFCs zum stärksten ^{19}F -Signal im Entzündungsbereich führte. ^{19}F -Signale der PFOB- und F-44E-PFCs an Tag drei betrugen ca. 37 % bzw. 43 % des PFCE-Signals. Im Gegensatz zu PFCE-PFCs verringert sich jedoch das ^{19}F -Signal der PFOB- und F-44E-PFCs im Ohr über die Zeit von 80 Tagen deutlich. Dies weist darauf hin, dass es im Falle der PFOB- und der F-44E-PFCs – nicht aber bei PFCE-PFCs – zu einer Freisetzung dieser Substanzen aus dem Entzündungsherd kommt.

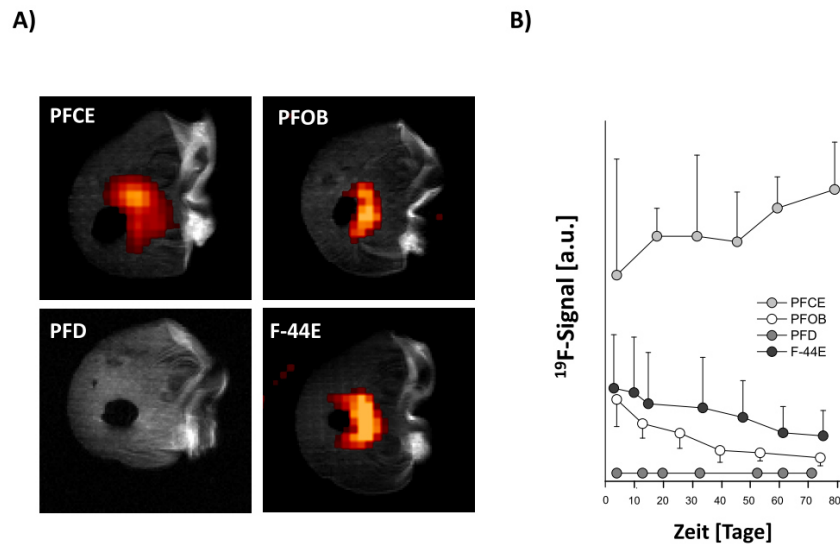


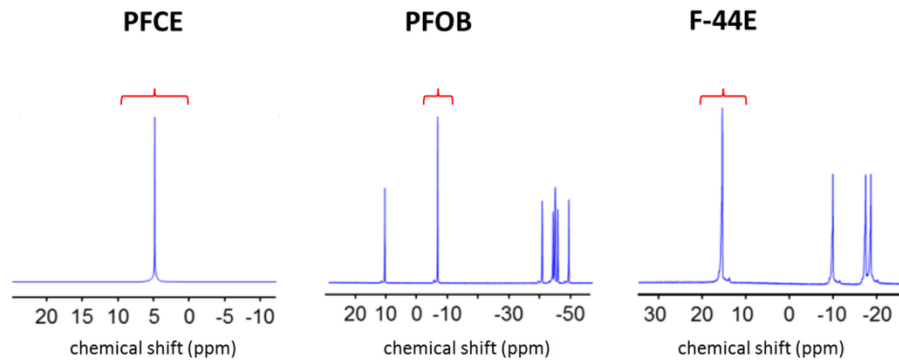
Abbildung II.17: *In vivo*-Darstellung von Entzündungsprozessen mittels ^{19}F -CSI: (A) Überlagerung von ^1H -/ ^{19}F -Bildern (das ^{19}F -Signal ist hier rot dargestellt) nach Ohrlochmarkierung und anschließender i.v. Injektion von PFCE-, PFOB-, PFD- und F-44E-PFCs. Für PFD-PFCs konnte nur nach *ex vivo* Langzeitmessungen ^{19}F -Signal im Ohr detektiert werden (hier nicht gezeigt). (B) Quantitative Analyse des ^{19}F -Signals im Entzündungsbereich über den Beobachtungszeitraum von 80 Tagen. Abbildung modifiziert nach Jacoby *et al.* (2014) [OA6].

II.3.2 Narrow Bandwidth Imaging (NBI)

Eine weitere Möglichkeit, artefaktfreie Bilder von PFCs mit komplexen Spektren zu erhalten, besteht darin, einzelne isolierte ^{19}F -Resonanzen gezielt anzuregen. Damit es nicht zu Überlagerungsbildern von benachbarten ^{19}F -Signalen kommt (siehe oben), muss die Bandbreite des Anregungspulses deutlich reduziert werden (Narrow Bandwidth Imaging = NBI). Dies lässt sich nicht für alle PFCs umsetzen, jedoch besitzen unter anderem F-44E und PFOB CF_3 -Gruppen, deren ^{19}F -Signale aufgrund der chemischen Verschiebung von den weiteren ^{19}F -Signalen deutlich separiert sind (s. Abb. II.18A). Zur selektiven Anregung dieser CF_3 -Gruppen wurde die Bandbreite des Anregungspulses der ^{19}F -Sequenz (Turbo-Spin-Echo) von 25.000 Hz auf 10.000 Hz reduziert und wiederum das Ohrloch-Entzündungsmodell eingesetzt (s.o.). Auch hierbei zeigten sich anhand der ^1H -/ ^{19}F -MRT-Messungen starke ^{19}F -Signale im Randbereich der Verletzung, insbesondere auf der Seite der Blutversorgung. Dies zeigt, dass obwohl bei PFOB und F-44E nur ein geringer Teil der ^{19}F -Atome für die Bildgebung genutzt wird, NBI prinzipiell dazu geeignet ist, Entzündungsprozesse sensitiv darzustellen. Obwohl sich NBI nur

bei gut isolierten ^{19}F -Signalen einsetzen lässt, bietet es jedoch einen deutlichen Zeitgewinn gegenüber der *Chemical Shift Imaging* Methode.

A)



B)

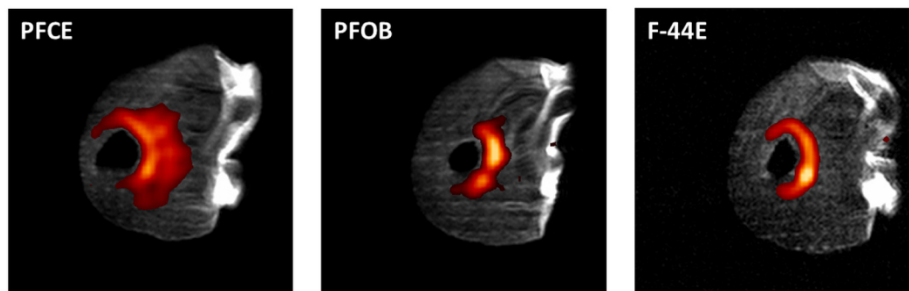


Abbildung II.18: Bildgebung von Entzündungsprozessen über „Narrow Bandwidth Imaging“: (A) ^{19}F -Spektren von PFCE, PFOB und F-44E. Die Breite der roten Klammer repräsentiert den Anregungsbereich des 10-kHz-Anregungspulses. (B) Artefaktfreie *in vivo*-Darstellung der Entzündung nach Ohrloch-Markierung. Abbildung angepasst nach Guden-Silber & Temme *et al.* (2018) [OA7].

II.4 Zusammenfassung

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt Forschungsarbeiten, die in den letzten Jahren zu verschiedenen Aspekten der Darstellung von Entzündungsprozessen mittels nichtinvasiver ^1H -/ ^{19}F -MRT durchgeführt wurden. Dabei wurden schwerpunktmäßig drei Themenbereiche bearbeitet: 1. Die Visualisierung von Zellen aufgrund ihrer endozytischen Eigenschaften. 2. Aufbau und Etablierung eines aktiven Targetings von PFCs. 3. Die Darstellung von PFCs mit komplexen ^{19}F -Spekten aber kurzen biologischen Halbwertszeiten. Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeiten sind hier noch einmal kurz zusammengefasst.

^{19}F -MRT von Zellen mit endozytischen Eigenschaften

OA1: Anhand eines neu entwickelten Entzündungsmodells wurde gezeigt, dass die sequentielle Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten über ^{19}F -MRT dargestellt werden kann und dass dies dazu geeignet ist, einen kompletten Entzündungsverlauf bis hin zur Heilung abzubilden.

OA2: Neben phagozytischen Immunzellen können auch epikardiale mesenchymale Progenitorzellen (EPDCs) des Herzens über ^{19}F -MRT visualisiert werden.

OA3: Nach der zellulären Aufnahme von fluoreszmarkierten PFCs kommt es zu einem Verlust des Fluoreszenzsignals, nicht aber des ^{19}F -Signals.

Aktives Targeting von PFCs

OA4: Ein spezifisches Targeting von PFCs an frühe Thromben ist *in vitro* und auch *in vivo* über die Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit einem spezifischen Peptidligand möglich. Die Spezifität des Targetings beruht dabei auf der Kombination aus Ligand und der PEGylierung der Partikeloberfläche.

OA5: In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scheller wurde ein aktives Targetingsystem entwickelt, welches auf synthetischen Cargo-Internalisierungs-Rezeptoren (CIRs) basiert. Wir konnten belegen, dass CIR-exprimierende Zellen spezifisch angesteuert und über ^{19}F -MRT visualisiert werden können.

^{19}F -MRT von PFCs mit komplexer spektraler Signatur

OA6: ^{19}F -Chemical Shift Imaging (CSI) ist dazu geeignet, PFCs mit komplexen Spektren artefaktfrei darzustellen, und empfindlich genug, um Entzündungsprozesse zu detektieren.

OA7: Liegen bei PFCs mit komplexen ^{19}F -Spektren gut isolierte ^{19}F -Resonanzen vor, können Entzündungsprozesse auch durch ^{19}F -Narrow Bandwidth Imaging (^{19}F -NBI) dargestellt werden.

III AUSBLICK

Die Darstellung von Entzündungsprozessen über ^{19}F -MRT mittels Markierung von phagozytischen Zelltypen oder über aktives Targeting lässt sich in Zukunft in der experimentellen Forschung für eine Vielzahl an Fragestellungen einsetzen, besitzt aber auch ein erhebliches translationales Potential. Die Besonderheiten der ^{19}F -MRT liegen darin, dass es keinen natürlichen ^{19}F -Hintergrund gibt und dass PFC-markierte Zellen oder Strukturen eindeutig in Form eines positiven Kontrasts nachgewiesen werden können. Im Gegensatz zu Methoden mit anderen MRT-Kontrastmitteln kann das ^{19}F -Bild zudem mit dem anatomische ^1H -Bild kombiniert werden, was Aufnahmen vor und nach Kontrastmittelgabe unnötig macht und eine exakte Lokalisation des entzündlichen *Hot Spots* ermöglicht. Schließlich ist das ^{19}F -Signal einfach quantifizierbar, wodurch das lokale Ausmaß der jeweiligen Entzündungen ermittelt werden kann.

Um die Spezifität zu verbessern, aber auch um die Bandbreite an Zielzellen/Strukturen zu erhöhen, wurde eine Plattform zum aktiven Targeting von PFCs etabliert. Diese umfasst (i) die Modifikation der Oberfläche über Polythylenglykol (PEG) mit dem Ziel, die Aufnahme der PFCs in phagozytische Zellen zu minimieren und (ii) die Kopplung von Targetingliganden an die Oberfläche von PFCs. Neben dem Targeting von frühen Thromben¹³⁵ und von Cargo-Internalisierungs-Rezeptoren (CIRs)¹³⁶ war es uns in der Vergangenheit zusätzlich möglich, die Bandbreite an Zielstrukturen durch Liganden gegen Fibrin, CD177 und gpIIb/IIIa zu erweitern (unveröffentlicht). Des Weiteren wurde eine Oberflächenproteomanalyse zur Identifikation neuartiger Zielstrukturen etabliert¹³⁷ und über ein Phagen-Display konnten EPDC-spezifische Peptide identifiziert werden (unveröffentlicht)¹³⁸. Diese Plattformtechnologie kann in Zukunft dazu genutzt werden, bestimmten Zellen bei entzündlichen Prozessen nichtinvasiv zu untersuchen und deren Einfluss auf Entzündungs- und Heilungsprozesse innerer Organe weiter aufzuklären. Über das CIR-System besteht zudem die Möglichkeit, auch Zellen mit geringen endozytischen Eigenschaften (z.B. T-Zellen) zu markieren. Durch diese Oberflächenliganden können aber auch gleichzeitig neuartige Therapeutika an bestimmte Strukturen und Zielzellen gebracht werden, um die Funktionalität von Zellen zu beeinflussen oder um eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration zu erreichen (Theranostik).

Großes Entwicklungspotential besteht auch in der gezielten Modifikation der PFCs hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften (Größe, Form, Oberflächenladung), welche die Zirkulationszeit im Blut, die Aufnahme in Zellen und das retikuloendotheliale System, aber auch die Diffusion durch permeable Endothelien beeinflussen. Zudem existieren weitere ^{19}F -Nanopartikel wie PLGA-, CaF_2 -NPs oder auch ^{19}F -Dendrimere, mit jeweils speziellen Eigenschaften. Mittels optimierter PFCs, PLGA-, CaF_2 -NPs oder auch ^{19}F -Dendrimern besteht die Möglichkeit, für bestimmte Anwendungen maßgeschneiderte ^{19}F -Nanopartikel herzustellen und einzusetzen. Eine Steigerung der Sensitivität

III Ausblick

kann über neue bzw. optimierte ^{19}F -Sequenzen oder durch neue Hardware erreicht werden. Kürzlich wurde eine ^{19}F -*Compressed Sensing* Methode beschrieben, die eine Reduktion der Messzeit um den Faktor 8 ermöglichte¹³⁹. Eine Verbesserung der Sensitivität um den Faktor 15 wurde mit einer neuartigen ^{19}F -Quadratur-Cryospule erreicht¹⁴⁰. Eine weitere Möglichkeit, das ^{19}F -Signal zu steigern, ist die Hyperpolarisierung von ^{19}F -Substanzen¹⁴¹. Jedoch sind hierfür sehr spezielle Bedingungen nötig, und der Effekt hält nur kurze Zeit an.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Möglichkeit einer ^{19}F -Mehrfarbenbildgebung. Perfluorkarbone sind eine recht große Substanzklasse, deren Moleküle zum Teil individuelle spektrale Signaturen besitzen. Da die einzelnen ^{19}F -Signale chemische Verschiebungen über einen großen Bereich aufweisen, ist es möglich, PFCs anhand ihres individuellen ^{19}F -Spektrums separat zu visualisieren. Durch Kombination von verschiedenen PFCs und Targetingliganden ließen sich unterschiedliche Zielstrukturen und Zellen darstellen. Dies würde es ermöglichen die lokale Immunzellzusammensetzung innerhalb eines Entzündungsherdes zu charakterisieren, um Informationen darüber zu gewinnen, ob eine Entzündung in die Resolutionsphase übergegangen ist oder ob eine chronische Entzündung vorliegt. Auch die Darstellung von thromboinflammatorischen Prozessen durch Ansteuern von Immunzellen und Plättchen oder Fibrin wäre ein interessanter Ansatz. Thromboinflammatorische Prozesse sind bei der Ruptur vulnerabler atherosklerotischer Plaques und aortaler Aneurysmen entscheidend beteiligt, und es wäre ein großer Fortschritt, wenn sich diejenigen Patienten identifizieren ließen, die ein sehr hohes Risiko hierfür aufweisen. In präliminären Arbeiten konnten wir bereits zeigen, dass die Kombination von Liganden gegen FXIIIa, Fibrin und aktivierte Plättchen dazu genutzt werden kann, das Stadium eines Thrombus zu bestimmen¹⁴². Da ältere Thromben erheblich schlechter auf thrombolytische Medikamente ansprechen, könnte dieser Ansatz dabei helfen einzuschätzen, ob eine entsprechende Therapie erfolgversprechend ist.

Schließlich kann die ^{19}F -MR-Bildgebung mit einer Vielzahl weiterer MR-Techniken wie T1-, T2-Mapping, CEST-Imaging, spektroskopischen Untersuchungen und auch funktionellen Analysen kombiniert werden, um zusätzliche Erkenntnisse über lokale Gewebebeschaffenheit und Stoffwechsel zu gewinnen. Dies würde es ermöglichen den Entzündungsherd exakter zu charakterisieren und Voraussagen über die Spätfolgen zu treffen. Somit bietet die ^{19}F -MRT in Kombination mit weiteren MR-Techniken im Rahmen einer multimodalen immunologischen MRT (iMRT) zukünftig die Möglichkeit, das Entstehen und die Auswirkungen von lokalen Entzündungsprozessen - in der Grundlagenforschung aber auch im klinischen Kontext - genauer zu untersuchen und aufzuklären. Gerade im Hinblick auf die individuelle Präzisionsmedizin könnte auf diese Weise der lokale inflammatorische Zustand bestimmt werden, um eine entsprechende therapeutische Entscheidung daraus abzuleiten und deren Konsequenzen über die Zeit zu verfolgen.

IV ANHANG

IV.1 Literaturverzeichnis

1. Frangogiannis, N. G. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr. Opin. Cardiol.* **30**, 240–245 (2015).
2. 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
3. Frasca, D., Blomberg, B. B. & Paganelli, R. Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Front. Immunol.* **8**, 1745 (2017).
4. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
5. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
6. Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G. & Chrissobolis, S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed Res. Int.* **2014**, 406960 (2014).
7. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
8. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
9. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689 (2007).
10. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–6751 (2011).
11. 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).
12. Foxman, E. F., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J. Cell Biol.* **139**, 1349–1360 (1997).
13. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **17**, 1381–1390 (2011).
14. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
15. Martin, C. J., Peters, K. N. & Behar, S. M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr. Opin. Microbiol.* **17**, 17–23 (2014).
16. Sunderkötter, C. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417 (2004).
17. Varol, C. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204**, 171–180 (2007).
18. Gautier, E. L., Jakubzick, C. & Randolph, G. J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1412–1418 (2009).
19. Le Borgne, M. *et al.* Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* **24**, 191–201 (2006).
20. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
21. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
22. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
23. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).

24. Zimmermann, H., Trautwein, C. & Tacke, F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front. Physiol.* **3**, 56 (2012).
25. Williams, J. W., Randolph, G. J. & Zinselmeyer, B. H. A polecat's view of patrolling monocytes. *Circ. Res.* **120**, 1699 (2017).
26. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191 (2005).
27. Serhan, C. N. & Petasis, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* **111**, 5922–5943 (2011).
28. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care* **17**, 24–35 (2004).
29. Clark, R. A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am. J. Med. Sci.* **306**, 42–48 (1993).
30. Sieggreen, M. Healing of physical wounds. *Nurs. Clin. North Am.* **22**, 439–447 (1987).
31. Ramasastry, S. S. Acute wounds. *Clin. Plast. Surg.* **32**, 195–208 (2005).
32. Witte, M. B. & Barbul, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin.* **77**, 509–528 (1997).
33. Baum, C. L. & Arpey, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol. Surg.* **31**, 674–686 (2005).
34. Suh, D. Y. & Hunt, T. K. Time line of wound healing. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **15**, 1–9 (1998).
35. Ganz, T. Macrophage function. *New Horiz. Baltim. Md* **1**, 23–27 (1993).
36. Greenhalgh, D. G. The role of apoptosis in wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 1019–1030 (1998).
37. Falanga, V. Wound healing and chronic wounds. *J. Cutan. Med. Surg.* **3 Suppl 1**, S1-1–5 (1998).
38. Hart, J. Inflammation. 2: Its role in the healing of chronic wounds. *J. Wound Care* **11**, 245–249 (2002).
39. O'Kane, S. Wound remodelling and scarring. *J. Wound Care* **11**, 296–299 (2002).
40. Rennen, H. J. J., Corstens, F. H. M., Oyen, W. J. G. & Boerman, O. C. New concepts in infection/inflammation imaging. *Q. J. Nucl. Med. Torino* **45**, 167–73 (2001).
41. Palestro, C. J. The current role of gallium imaging in infection. **24**, 128–141 (1994).
42. Dams, E. T., Oyen, W. J., Boerman, O. C. & Claessens, R. A. Technetium-99m labeled to human immunoglobulin G through the nicotinyl hydrazine derivative: a clinical study. *J. Nucl. Med.* **39**, 119 (1998).
43. Datz, F. L. *et al.* The efficacy of indium-111-polyclonal IgG for the detection of infection and inflammation. *Nucl Med* **35**, 74–83 (1994).
44. Laverman, P. *et al.* Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Deliv. Syst. Vivo Diagn.* **37**, 225–235 (1999).
45. Rusckowski, M., Paganelli, G., Hnatowich, D. J. & Magnani, P. Imaging osteomyelitis with streptavidin and indium-111-labeled biotin. *J. Nucl. Med.* **37**, 1655 (1996).
46. Samuel, A., Paganelli, G., Chiesa, R. & Sudati, F. Detection of prosthetic vascular graft infection using avidin/indium-111-biotin scintigraphy. *J. Nucl. Med.* **37**, 55 (1996).
47. Peters, A. M. The utility of [99mTc]HMPAO-leukocytes for imaging infection. *Semin. Nucl. Med.* **24**, 110–127 (1994).
48. Babich, J. *et al.* Technetium-99m-labeled chemotactic peptides: comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. *J. Nucl. Med.* **34**, 2176–2181 (1993).
49. Cavelliers, V. *et al.* Evaluation of 99mTc-RP128 as a potential inflammation imaging agent: human dosimetry and first clinical results. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **42**, 154–161 (2001).
50. Moyer, B. R. *et al.* Technetium-99m-white blood cell-specific imaging agent developed from platelet factor 4 to detect infection. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **37**, 673–679 (1996).
51. van der Laken, C. J. *et al.* Specific targeting of infectious foci with radioiodinated human recombinant interleukin-1 in an experimental model. *Eur. J. Nucl. Med.* **22**, 1249–1255 (1995).
52. Chrapko, B. E. *et al.* Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis of inflammatory and infectious vascular disease. *Nucl. Med. Rev.* **19**, 28–36 (2016).
53. Jamar, F. *et al.* EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. *J. Nucl. Med.* **54**, 647–658 (2013).

54. Almuhaideb, A., Papathanasiou, N. & Bomanji, J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann. Saudi Med.* **31**, 3–13 (2011).
55. Fukuzumi, M., Shinomiya, H., Shimizu, Y., Ohishi, K. & Utsumi, S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. *Infect. Immun.* **64**, 108–112 (1996).
56. Gamelli Richard L, Liu Hong, He Li-Ke & Hofmann Cecilia A. Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 639–647 (1996).
57. Schuster, D. P. *et al.* Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L845–L851 (2007).
58. Wu, B. *et al.* An overview of CEST MRI for non-MR physicists. *EJNMMI Phys.* **3**, (2016).
59. Hingorani, D. V., Bernstein, A. S. & Pagel, M. D. A review of responsive MRI contrast agents: 2005–2014. *Contrast Media Mol. Imaging* **10**, 245–265 (2015).
60. Lauffer, R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.* **87**, 901–927 (1987).
61. Jerosch-Herold, M. & Kwong, R. Y. Magnetic resonance imaging in the assessment of ventricular remodeling and viability. *Curr. Heart Fail. Rep.* **5**, 5–10 (2008).
62. Kramer, C. M. The expanding prognostic role of late gadolinium enhanced cardiac magnetic resonance. (2006).
63. Knopp, M. V., Giesel, F. L., Marcos, H., von Tengg-Kobligk, H. & Choyke, P. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in oncology. *Top. Magn. Reson. Imaging* **12**, 301–308 (2001).
64. Leiner, T. Magnetic resonance angiography of abdominal and lower extremity vasculature. *Top. Magn. Reson. Imaging* **16**, 21–66 (2005).
65. Sirol, M. *et al.* Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contrast agent. *Circulation* **112**, 1594–1600 (2005).
66. Sirol, M. *et al.* Fibrin-targeted contrast agent for improvement of in vivo acute thrombus detection with magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis* **182**, 79–85 (2005).
67. Spuentrup, E. *et al.* MR imaging of thrombi using EP-2104R, a fibrin-specific contrast agent: initial results in patients. *Eur. Radiol.* **18**, 1995–2005 (2008).
68. Vymazal, J. *et al.* Thrombus imaging with fibrin-specific gadolinium-based MR contrast agent. *Invest. Radiol.* **44**, 697–704 (2009).
69. Thomsen, H. S. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious late adverse reaction to gadodiamide. (2006).
70. Errante, Y. *et al.* Progressive increase of T1 signal intensity of the dentate nucleus on unenhanced magnetic resonance images is associated with cumulative doses of intravenously administered gadodiamide in patients with normal renal function, suggesting dechelation. *Invest. Radiol.* **49**, 685–690 (2014).
71. McDonald, R. J. *et al.* Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* **275**, 772–782 (2015).
72. Bulte, J. W. M. & Kraitchman, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* **17**, 484–499 (2004).
73. Corot, C., Robert, P., Idée, J.-M. & Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1471–1504 (2006).
74. Cromer Berman Stacey M., Walczak Piotr & Bulte Jeff W.M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **3**, 343–355 (2011).
75. Anzai Yoshimi *et al.* MR angiography with an ultrasmall superparamagnetic iron oxide blood pool agent. *J. Magn. Reson. Imaging* **7**, 209–214 (2005).
76. Hancu, I. *et al.* CEST and PARACEST MR contrast agents. *Acta Radiol.* **51**, 910–923 (2010).
77. Holland, G. N., Bottomley, P. A. & Hinshaw, W. S. 19F magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson.* **28**, 133–136 (1977).
78. Yu, J., Kodibagkar, V. D., Cui, W. & Mason, R. P. 19F: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. *Curr. Med. Chem.* **12**, 819–848 (2005).

79. Ruiz-Cabello, J., Barnett, B. P., Bottomley, P. A. & Bulte, J. W. M. Fluorine (¹⁹F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed.* **24**, 114–129 (2011).
80. Bulte, J. W. M. Hot spot MRI emerges from the background. *Nat. Biotechnol.* **23**, 945–946 (2005).
81. Riess, J. G. Oxygen carriers ('blood substitutes')--raison d'être, chemistry, and some physiology. *Chem. Rev.* **101**, 2797–2920 (2001).
82. Ahrens, E. T. & Zhong, J. In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection. *NMR Biomed.* **26**, 860–871 (2013).
83. Grapentin, C. *et al.* Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by ¹⁹F MRI. in *Nanomedicine* 268–286 (One Central Press, 2014).
84. Krafft, M. P. & Riess, J. G. Chemistry, physical chemistry, and uses of molecular fluorocarbon--hydrocarbon diblocks, triblocks, and related compounds--unique 'apolar' components for self-assembled colloid and interface engineering. *Chem. Rev.* **109**, 1714–1792 (2009).
85. Janjic, J. M. & Ahrens, E. T. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**, 492–501 (2009).
86. Srinivas, M., Boehm-Sturm, P., Figdor, C. G., de Vries, I. J. & Hoehn, M. Labeling cells for in vivo tracking using ¹⁹F MRI. *Biomaterials* **33**, 8830–8840 (2012).
87. Longmaid, H. E. 3rd *et al.* In vivo ¹⁹F NMR imaging of liver, tumor, and abscess in rats. Preliminary results. *Invest. Radiol.* **20**, 141–145 (1985).
88. Noth, U. *et al.* Perfluoro-15-crown-5-ether labelled macrophages in adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **25**, 243–254 (1997).
89. Sotak, C. H. *et al.* A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **29**, 188–195 (1993).
90. Flögel, U. *et al.* In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* **118**, 140–148 (2008).
91. Ebner, B. *et al.* Early assessment of pulmonary inflammation by ¹⁹F MRI in vivo. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **3**, 202–210 (2010).
92. 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).
93. Flögel, U. *et al.* Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 146ra108 (2012).
94. Jacoby, C. *et al.* Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by ¹⁹F MRI in vivo. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **27**, 101–106 (2014).
95. Balducci, A., Helfer, B. M., Ahrens, E. T., O'Hanlon, C. F. 3rd & Wesa, A. K. Visualizing arthritic inflammation and therapeutic response by fluorine-19 magnetic resonance imaging (¹⁹F MRI). *J. Inflamm. Lond. Engl.* **9**, 24 (2012).
96. Gaudet, J. M., Hamilton, A. M., Chen, Y., Fox, M. S. & Foster, P. J. Application of dual (¹⁹F) and iron cellular MRI agents to track the infiltration of immune cells to the site of a rejected stem cell transplant. *Magn. Reson. Med.* **78**, 713–720 (2017).
97. Hertlein, T. *et al.* Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of *Staphylococcus aureus* by ¹⁹F-magnetic resonance imaging (MRI). *PLoS One* **6**, e18246 (2011).
98. Hitchens, T. K. *et al.* ¹⁹F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn. Reson. Med.* **65**, 1144–1153 (2011).
99. Shin, S. H., Kadayakkara, D. K. & Bulte, J. W. M. In Vivo ¹⁹F MR Imaging Cell Tracking of Inflammatory Macrophages and Site-specific Development of Colitis-associated Dysplasia. *Radiology* **282**, 194–201 (2017).
100. Waiczies, H. *et al.* Visualizing brain inflammation with a shingled-leg radio-frequency head probe for ¹⁹F/¹H MRI. *Sci. Rep.* **3**, 1280 (2013).
101. Weise, G. *et al.* In vivo imaging of stepwise vessel occlusion in cerebral photothrombosis of mice by ¹⁹F MRI. *PLoS One* **6**, e28143 (2011).

102. Zhong, J., Narsinh, K., Morel, P. A., Xu, H. & Ahrens, E. T. In vivo quantification of inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats using fluorine-19 magnetic resonance imaging reveals immune cell recruitment outside the nervous system. *PLoS One* **10**, e0140238 (2015).
103. 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).
104. Liu, X. *et al.* Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat. Immunol.* **13**, 457 (2012).
105. Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1173–R1187 (2010).
106. Loke, P., MacDonald, A. S., Robb, A., Maizels, R. M. & Allen, J. E. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2669–2678 (2000).
107. Denney, L. *et al.* Activation of invariant NKT cells in early phase of experimental autoimmune encephalomyelitis results in differentiation of Ly6Chi inflammatory monocyte to M2 macrophages and improved outcome. *J. Immunol.* 1103608 (2012).
108. Tsai, C., Ma, R. & Shieh, T. Deficiency in collagen and fibronectin phagocytosis by human buccal mucosa fibroblasts in vitro as a possible mechanism for oral submucous fibrosis. *J. Oral Pathol. Med.* **28**, 59–63 (1999).
109. Hall, S. E., Savill, J. S., Henson, P. M. & Haslett, C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J. Immunol.* **153**, 3218–3227 (1994).
110. Hinds, K. A. *et al.* Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* **102**, 867–872 (2003).
111. Wu, T.-J. *et al.* Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 682 (2013).
112. Gittenberger-de Groot, A. C. *et al.* The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation* **84**, 41–53 (2012).
113. Zhou, B. *et al.* Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J. Clin. Invest.* **121**, 1894–1904 (2011).
114. Ruiz-Villalba, A. *et al.* Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 2057–2066 (2015).
115. van Wijk, B., Gunst, Q. D., Moorman, A. F. M. & van den Hoff, M. J. B. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One* **7**, e44692 (2012).
116. Ding, Z. *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).
117. Baxter, G. M., McKechnie, S. & Duffy, P. Colour Doppler ultrasound in deep venous thrombosis: a comparison with venography. *Clin. Radiol.* **42**, 32–36 (1990).
118. Thomas, S. M., Goodacre, S. W., Sampson, F. C. & van Beek, E. J. R. Diagnostic value of CT for deep vein thrombosis: results of a systematic review and meta-analysis. *Clin. Radiol.* **63**, 299–304 (2008).
119. Sampson, F. C., Goodacre, S. W., Thomas, S. M. & van Beek, E. J. R. The accuracy of MRI in diagnosis of suspected deep vein thrombosis: systematic review and meta-analysis. *Eur. Radiol.* **17**, 175–181 (2007).
120. Andia, M. E. *et al.* Fibrin-targeted magnetic resonance imaging allows in vivo quantification of thrombus fibrin content and identifies thrombi amenable for thrombolysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1193–1198 (2014).
121. Oliveira, B. L. & Caravan, P. Peptide-based fibrin-targeting probes for thrombus imaging. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 **46**, 14488–14508 (2017).
122. Spuentrup, E. *et al.* Molecular magnetic resonance imaging of atrial clots in a swine model. *Circulation* **112**, 396–399 (2005).
123. Robinson, B. R., Hough, A. K. & Reed, G. L. Catalytic life of activated factor XIII in thrombi. Implications for fibrinolytic resistance and thrombus aging. *Circulation* **102**, 1151–1157 (2000).

124. Chen, J. W. *et al.* Selective factor XIIa inhibition attenuates silent brain ischemia: application of molecular imaging targeting coagulation pathway. *JACC Cardiovasc. Imaging* **5**, 1127–1138 (2012).
125. Jaffer, F. A. *et al.* Molecular imaging of factor XIIIa activity in thrombosis using a novel, near-infrared fluorescent contrast agent that covalently links to thrombi. *Circulation* **110**, 170–176 (2004).
126. Miserus, R.-J. J. *et al.* Molecular MRI of early thrombus formation using a bimodal α 2-antiplasmin based contrast agent. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2**, 987–996 (2009).
127. Tung, C. *et al.* Novel factor XIII probes for blood coagulation imaging. *Chembiochem* **4**, 897–899 (2003).
128. Temme, S., Grapentin, C., Güden-Silber, T. & Flögel, U. Active targeting of perfluorocarbon nanoemulsions. in *Fluorine Magnetic Resonance Imaging* 97–133 (CRC Press, 2016).
129. Westrick, R. J., Winn, M. E. & Eitzman, D. T. Murine models of vascular thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2079–2093 (2007).
130. 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).
131. 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).
132. Jürgensen, H. J. *et al.* Complex determinants in specific members of the mannose receptor family govern collagen endocytosis. *J. Biol. Chem.* jbc-M113 (2014).
133. Indik, Z., Kelly, C., Chien, P., Levinson, A. & Schreiber, A. Human Fc gamma RII, in the absence of other Fc gamma receptors, mediates a phagocytic signal. *J. Clin. Invest.* **88**, 1766–1771 (1991).
134. Mitchell, M. A. *et al.* Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis [published erratum appears in Blood 1994 Nov 1; 84 (9): 3252]. *Blood* **84**, 1753–1759 (1994).
135. Temme, S. *et al.* Noninvasive imaging of early venous thrombosis by ¹⁹F magnetic resonance imaging with targeted perfluorocarbon nanoemulsions. **131**, (2015).
136. Temme, S. *et al.* A synthetic cargo internalization receptor system for nanoparticle tracking of individual cell populations by fluorine magnetic resonance imaging. *ACS Nano* (2018). doi:10.1021/acsnano.8b05698
137. Temme, S. *et al.* Genetic profiling and surface proteome analysis of human atrial stromal cells and rat ventricular epicardium-derived cells reveals novel insights into their cardiogenic potential. *Stem Cell Res.* **25**, 183–190 (2017).
138. Straub, T. Aktives Targeting von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs) für das in-vivo Imaging von epicardialen Zellen nach Myocardinfarkt. Master Thesis (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2017).
139. Zhong, J., Mills, P. H., Hitchens, T. K. & Ahrens, E. T. Accelerated fluorine-19 MRI cell tracking using compressed sensing. *Magn. Reson. Med.* **69**, 1683–1690 (2013).
140. Waiczies, S. *et al.* Enhanced fluorine-19 MRI sensitivity using a cryogenic radiofrequency probe: technical developments and ex vivo demonstration in a mouse model of neuroinflammation. *Sci. Rep.* **7**, 9808 (2017).
141. Lee, Y., Zeng, H., Ruedisser, S., Gossert, A. D. & Hilty, C. Nuclear magnetic resonance of hyperpolarized fluorine for characterization of protein–ligand interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17448–17451 (2012).
142. Temme, S. *et al.* Assessment of Thrombus Stage by ‘Multicolor’ ¹⁹F MRI. in *Proceedings of the EMIM - 11th European Molecular Imaging Meeting* (2016).

IV.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich den folgenden Personen für ihre Hilfe und Unterstützung danken.

Professor Dr. Jürgen Schrader und Prof. Dr. Ulrich Flögel für ihre stete Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit, die Vielzahl von Anregungen und Diskussionen, sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Molekulare Kardiologie und der Abteilung für experimentelle kardiovaskuläre Bildgebung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Nadine und unseren beiden Jungs Paul und Henri für ihre große Hilfe & Unterstützung, ihr Verständnis, Geduld und dafür immer eine Handbreit Wasser unter dem Kiel zu haben. Danken möchte ich auch meinen Eltern und insbesondere meinen Schwiegereltern Mechtild und Bernd für die Auszeiten, die sie uns ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich Christoph Jacoby, Dr. Ding, Christoph Grapentin, Pascal Bouvain und Frau Menke danken: Christoph Jacoby für sein Bemühen einem Biologen die grundlegenden Kenntnisse zur MR-Bildgebung verständlich nahe zu bringen; Dr. Ding für seine Unterstützung bei tierexperimentellen Versuchen; Christoph Grapentin für seine pharmazeutische Sichtweise & Pascal Bouvain für sein Engagement beim Aufbau eines aktiven Targetingsystems für Zellen; Frau Menke für die große Hilfe bei allen administrativen Dingen.

Mein Dank geht auch an: Christoph Owenier, Florian Bönner, Nadine Borg, Tuba Güden-Silber, Sebastian Haberkorn, Tamara Straub, Vera Flocke, Julia Nave, Julia Kistner, Bodo Steckel, Jutta Ziemann, sowie allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie und des Instituts für Herz Kreislauf Physiologie für Ihre Hilfsbereitschaft, Kooperation und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartnern für die Unterstützung und interessante Zusammenarbeit bedanken: Prof. Dr. Rolf Schubert in Freiburg (F. Mayenfels, C. Grapentin, W. Krämer, S. Barnert), Prof. Dr. Jürgen Scheller (P. Baran, D. Floss, J.M. Moll) und Prof. Dr. Maria Grandoch & Prof. Dr. J.W. Fischer (A. Zimmermann).

IV.3 Ausgewählte Originalarbeiten

OA1: Temme S[§], Jacoby C, Ding Z, Bönner F, Borg N, Schrader J, Flögel U. Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive ¹⁹F MRI. J Leukoc Biol. 2014; 95(4):689-97. § = Corresponding author

OA2: Ding Z, Temme S, Quast C, Friebe D, Jacoby C, Zanger K, Bidmon HJ, Grapentin C, Schubert R, Flögel U, Schrader J. Epicardium-derived cells formed after myocardial injury display phagocytic activity permitting in vivo labeling and tracking. Stem Cells Transl Med. 2016; 5(5):639-50.

OA3: Bouvain P, Flocke V, Krämer W, Schubert R, Schrader J, Flögel U*, Temme S*. Dissociation of ¹⁹F and fluorescence signal upon cellular uptake of dual contrast perfluorocarbon nanoemulsions. MAGMA 2018; doi: 10.1007/s10334-018-0723-7. [Epub ahead of print]; *= Equal contribution

OA4: Temme S, Grapentin C, Quast C, Jacoby C, Grandoch M, Ding Z, Owenier C, Mayenfels F, Fischer JW, Schubert R, Schrader J, Flögel U. Noninvasive imaging of early venous thrombosis by ¹⁹F magnetic resonance imaging with targeted perfluorocarbon nanoemulsions. Circulation. 2015; 131(16):1405-14.

OA5: Temme S*, Baran P*, Bouvain P*, Grapentin C, Krämer W, Knebel B, Al-Hasani H, Moll J, Floss D, Schrader J, Schubert R, Flögel[#] and Jürgen Scheller[#]. A synthetic cargo internalization receptor system for nanoparticle tracking of individual cell populations by fluorine magnetic resonance imaging. ACS Nano. 2018; 12(11):11178-11192. *,# = Equal contribution

OA6: Jacoby C, Temme S, Mayenfels F, Benoit N, Krafft MP, Schubert R, Schrader J, Flögel U. Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by ¹⁹F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. NMR Biomed. 2014; 27(3):261-71.

OA7: Güden-Silber T*, Temme S*, Jacoby C, Flögel U. Biomedical ¹⁹F MRI using perfluorocarbons. Methods Mol Biol. 2018; 1718:235-257. * = Equal contribution

IV.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde, welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Erklärung zur Einhaltung von ethischen Grundsätzen und guter wissenschaftlicher Praxis

Hiermit wird bestätigt, dass alle Vorschriften zur Verwendung von menschlichem Material, der jeweiligen Datenschutzbestimmungen und die Gesetze zur Durchführung von Tierversuchen eingehalten wurden.

Bonn, den 22.05.2019

Sebastian Temme