Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Komm. Leiter: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Flögel

# "Etablierung und Optimierung eines aktiven Targetings für murine Neutrophile Granulozyten im Rahmen der <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung"

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Shiwa Kadir 2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. Ulrich Flögel Zweitgutachter: PD Dr. Sebastian Temme Gewidmet meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinem Ehemann in Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bouvain, P., Ding, Z., **Kadir, S.**, Kleimann, P., Kluge, N., Tiren, Z.-B., Steckel, B., Flocke, V., Zalfen, R., Petzsch, P., Wachtmeister, T., John, G., Subramaniam, N., Krämer, W., Strasdeit, T., Mehrabipour, M., Moll, J. M., Schubert, R., Ahmadian, M. R., Bönner, F., Boeken, U., Westenfeld, R., Engel, D. R., Kelm, M., Schrader, J., Köhrer, K., Grandoch, M.\*; Temme, S.\*, Flögel, U.\*, (2023), Non-invasive Mapping of Systemic Neutrophil Dynamics upon Cardiovascular Injury. *Nature Cardiovascular Research*, (2) 126 – 143

\* = geteilte Letztautorenschaft

## Zusammenfassung

Entzündungen spielen in nahezu jedem Krankheitsprozess eine beträchtliche Rolle. Wichtige zelluläre Mitspieler, sowohl bei akuten als auch chronischen Entzündungen sind Neutrophile Granulozyten. Über die nichtinvasive Darstellung von Neutrophilen Granulozyten innerhalb des betroffenen Gewebes ließen sich wichtige Informationen über den Schweregrad und die Phase der Entzündungsreaktion gewinnen.

In den letzten Jahren wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Verfahren entwickelt, mit dem sich entzündliche Prozesse mittels sog. kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F MRT qualitativ und quantitativ untersuchen lassen. Hierfür werden sog. Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) eingesetzt, die nach intravenöser Injektion von phagozytischen Immunzellen (v. a. Monozyten und Makrophagen) aufgenommen werden, die sich am Entzündungsherd anreichern. Zwar werden Neutrophile Granulozyten unter bestimmten Bedingungen auch passiv mit PFCs beladen, aber dies ist recht ineffizient und daher sind lokale <sup>19</sup>F Signale zumeist nicht spezifisch für Neutrophile Granulozyten. Das Ziel dieser Arbeit war es daher zum einen ein spezifisches Targeting für Neutrophile Granulozyten zu entwickeln und dieses durch Veränderung der Partikeleigenschaften zu optimieren. Zu diesem Zweck wurden PFCs hergestellt, die mit einem Peptid funktionalisiert wurden (mNGP), welches an einem bestimmten Oberflächenrezeptor der Neutrophilen, dem mCD177, bindet (mNGPPFCs). Die Spezifität der mNGPPFCs wurde in Versuchen mit einem Kontrollpeptid überprüft. Anschließend wurden diese <sup>mNGP</sup>PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), Fluoreszenzspektroskopie (IVIS), so wie <sup>19</sup>F MRT hinsichtlich Partikelgröße, Fluoreszenzintensität und Fluorgehalt charakterisiert. Es wurde zudem untersucht, ob der Peptidgehalt der mNGPPFCs einen Einfluss auf die Bindung an Neutrophile hat. Die Ergebnisse zeigten eine bessere Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile bei einem fünffachen Unterschuss von mNGP zum vorhandenen Maleimid, also bei einer Konzentration von 35 µM des Peptides. Außerdem galt es zu untersuchen, ob die Partikelgröße der <sup>mNGP</sup>PFCs einen Einfluss auf die Bindung und Aufnahme von Neutrophilen hat. Hierzu wurden durch Veränderung des Lipidgehaltes PFCs hergestellt, die einen Durchmesser von 150 nm, 350 nm und 500 nm besitzen. In vitro und in vivo Versuche ergaben, dass <sup>350nm</sup>PFCs im Vergleich zu <sup>150nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs, die beste Aufnahme durch Neutrophile Granulozyten zeigten. Ferner wurde untersucht, ob die Bindung und Aufnahme <sup>mNGP</sup>PFCs unter entzündlichen Bedingungen verändert ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von <sup>mNGP</sup>PFCs durch Neutrophile, die entweder in vitro mit LPS stimuliert wurden, oder die aus Mäusen gewonnen wurden, denen subkutan Matrigel mit LPS implantiert wurde, erheblich ansteigt. Dies konnte auf die stärkere Expression von mCD177 auf der Oberfläche der Neutrophilen zurückgeführt werden. Schließlich konnte wiederum in Mäusen, denen Matrigel/LPS implantiert wurde gezeigt werden, dass nach intravenöser Injektion von <sup>350nm</sup>PFCs der Entzündungsherd mittels in situ kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT erfolgreich dargestellt werden kann.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine spezifische Ansteuerung und Beladung von murinen Neutrophilen Granulozyten über die Funktionalisierung von PFCs mittels eines Peptids gegen CD177 (<sup>mNGP</sup>PFCs) möglich ist. <sup>mNGP</sup>PFCs werden zudem unter entzündlichen Bedingungen verstärkt von Neutrophilen Granulozyten aufgenommen und <sup>mNGP</sup>PFCs mit einem Durchmesser von 350 nm zeigten *in vitro* und *in vivo* die besten Targeting-Eigenschaften für murine Neutrophilen Granulozyten.

## **Summary**

Inflammation plays a considerable role in almost every disease process. Important cellular players in both acute and chronic inflammation are neutrophil granulocytes. Non-invasive imaging of neutrophil granulocytes within the affected tissue could provide important information about the severity and phase of the inflammatory response.

In recent years, a method has been developed in our research group that allows the qualitative and quantitative investigation of inflammatory processes by means of combined <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F MRI. For this purpose, perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) are used, which are taken up by phagocytic immune cells (mainly monocytes and macrophages) after intravenous injection and accumulate at the site of inflammation. Although neutrophil granulocytes are also passively loaded with PFCs under certain conditions, this is quite inefficient. Local <sup>19</sup>F signals are therefore not specific for neutrophils.

The aim of this work was therefore firstly to develop a specific targeting for neutrophil granulocytes and secondly to optimize this by altering the particle properties.

To this end, PFCs were prepared that were functionalized with a peptide (mNGP) that binds to a specific neutrophil surface receptor, mCD177 (<sup>mNGP</sup>PFCs). The specificity of the <sup>mNGP</sup>PFCs was tested in experiments with a control peptide. Subsequently, these <sup>mNGP</sup>PFCs were characterized by dynamic light scattering (DLS), fluorescence spectroscopy (IVIS), as well as <sup>19</sup>F MRI in terms of particle size, fluorescence intensity, and fluorine content.

It was also investigated whether the peptide content of the <sup>mNGP</sup>PFCs had an effect on their binding to neutrophils. The results showed the best binding properties were obtained with a mNGP concentration of 35  $\mu$ M. Next, it was investigated whether the particle size of the <sup>mNGP</sup>PFCs had an effect on binding to neutrophils. For this purpose, PFCs with diameters of 150 nm, 350 nm, and 500 nm were prepared by changing the lipid content. *In vitro* and *in vivo* experiments revealed that <sup>350nm</sup>PFCs compared to <sup>150nm</sup>PFCs and <sup>500nm</sup>PFCs, showed the best uptake by neutrophil granulocytes. Furthermore, it was investigated whether the binding and uptake of <sup>mNGP</sup>PFCs is altered under inflammatory conditions. These experiments revealed that uptake of <sup>mNGP</sup>PFCs by neutrophils either stimulated *in vitro* with LPS or obtained from mice implanted subcutaneously with Matrigel containing LPS increased significantly. This could be attributed to the greater expression of mCD177 on the surface of neutrophils. Finally, again in mice implanted with Matrigel/LPS, it was shown that after intravenous injection of <sup>350nm</sup>PFCs, the inflammatory focus could be successfully visualized by in situ combined <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F MRI.

In summary, this work demonstrated that specific targeting and loading of murine neutrophil granulocytes is possible via functionalization of PFCs using a peptide against CD177 (<sup>mNGP</sup>PFCs). <sup>mNGP</sup>PFCs show an increased uptake under inflammatory conditions and <sup>mNGP</sup>PFCs with a diameter of 350 nm are best suited for *in vitro* and *in vivo* targeting of murine neutrophil granulocytes.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α2ΑΡ	Antiplasminpeptid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
Con	Kontrolle
DAMP	damage-associated
	molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-
	phenylindol,
	Dihydrochlorid
DC	dendritic cells
d. h.	das heißt
DLS	Dynamische
	Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's modified eagle
	medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EPR	enhanced permeability and
EPR	enhanced permeability and retention
EPR et al.	enhanced permeability and retention et alteri

FACS	fluorescent activated cell
	scanning/ sorting
FDA	united states food and
	drug administration
FSC	forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOV	field of view
FXIIIa/	Faktor XIIIa
XIIIa	(Fibrinstabilisierender
	Faktor)
g	Gramm
G	Gauge
Gd	Gadolinium
GPI	Glykosylphosphatidyl-
	inositol
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-
	stimulierender Faktor
h	Stunden
Н	Wasserstoff
HNP	human neutrophil peptide
IL	Interleukin
IVIS	In Vivo Imaging System
i. v.	Intravenös
J	Jod
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

Kryo-	Kryo-	
TEM	Transmissionselektronen-	
	mikroskopie	
LPS	Lipopolysaccharid	
m	murin	
MACS	high-gradient magnetic	
	cell sorting	
MFI	Mittlere	
	Fluoreszenzintensität	
mg	Milligramm	
μg	Mikrogramm	
МНС	major histocompatibility	
	complex	
Mhz	Megahertz	
min	Minuten	
ml	Milliliter	
μl	Mikroliter	
Μ	Molarität	
mM	Millimolar	
ММР	Matrix-Metalloproteinase	
μm	Mikrometer	
MRT	Magnetresonanz-	
	tomographie	
NB1	Neutrophil Antigen B1	
	(CD177)	
NE	Nanoemulsion	
NET	neutrophil extracellular	
	traps	
NGP	neutrophilic granule	
	protein	
nm	Nanometer	

NMR	nuclear magnetic
	resonance
NSF	Nephrogene Systemische
	Fibrose
o/w	Öl in Wasser
PAGE	perfluorcarbon associated
	gas exchange
PAMP	pathogen associated
	molecular patterns
PBS	Phosphat buffered saline
PCS	Photonen-
	Korrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	platelet endothelial cell
	adhesion molecule-1
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Perfluorkarbon
PFCE	Perfluorkronenether
PFOB	Perfluoroktylbromid
рН	negativer dekadischer
	Logarithmus der
	Wasserstoffionen-
	konzentration
PLV	partial liquid ventilation
PRR	pathogen recognition
	receptor
RES	Retikuloendotheliales
	System
ROI	region of interest

ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S.	siehe
SNP	single nucleotid
	polymorphismus
SPIO	superparamagnetic iron
	oxide nanoparticle
SSC	sideward scatter
T1	longitudinale
	Relaxationszeit
T2	transversale
	Relaxationszeit
Tab.	Tabelle
Tc	Technetium

TEM	Transmissionselektronen-
	mikroskopie
TGF-ß	transforming growth
	factor ß
VEGF-A	vaskulärer endothelialer
	Wachstumsfaktor A
Vol.	Volumen
w/o	Wasser in Öl
w/w	Gewichtsprozent
xg	Relative
	Zentrifugalbeschleunigung
	(RZB)
ζ	Zeta
z. B.	zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1. Initiation und Ablauf von entzündlichen Prozessen	1
2. Die Rolle von Neutrophilen Granulozyten bei entzündlichen Prozessen	3
3. Darstellung von entzündlichen Prozessen über Magnetresonanztomographie (MRT)	5
3.1. Kombinierte <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-Magnetresonanzbildgebung	6
4. Perfluorkarbone und Perfluorkarbon-Nanoemulsionen	7
5. TARGETING VON ZELLEN	9
5.1. Passives Zelltargeting	9
5.2. Aktives Zelltargeting	10
6. Ziele der Arbeit	12
MATERIALIEN	13
1. Geräte	13
2. Verbrauchsmaterialien	15
3. Puffersysteme, Medien und Chemikalien	15
4. Antikörper	17
5. Peptide	17
6. Versuchstiere	17
7. Software	18
METHODEN	19
1. Präparation der Mäuse	19
1.1. Matrigelimplantation	19
1.2. Isolation von murinen Immunzellen	20
1.2.1. Blutentnahme über die Schwanzvene	20
1.2.2. Punktion der Vena cava inferior	20
1.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark	20
1.2.4 Aufbereitung des entnommenen Blutes und Knochenmarks	21
1.3. Isolation von Zellen aus s.c. implantieren Matrigelen	21
1.4. Intravenöse Injektion von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)	22
2. OBERFLÄCHENEXPRESSION VON CD177 AUF MURINEN IMMUNZELLEN	22
2.1. Durchflusszytometrie	22
2.1.1. Zellzählungen mittels Durchflusszytometrie	24
2.2. Durchflusszytometrische Analyse muriner Immunzellen	25

2.2.1 Oberflächenmarkierung von CD177 auf murinen Neutrophile Granulozyten	25
2.3. Bindung von mNGP an murine Neutrophile Granulozyten	26
2.3.1. Einfluss der Peptidkonzentration auf die Bindungseigenschaften	26
2.3.2. Kopplung von mNGP an einen 8-Arm-PEG-Anker	27
3. Herstellung und Charakterisierung von Nanoemulsionen	27
3.1. Herstellung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen	27
3.1.1. Herstellung von PFCs verschiedener Größen	29
3.1.2. Hochdruckhomogenisation	30
3.1.3. Herstellung spezifischer PFCs durch Kopplung von Peptiden	30
3.2. Charakterisierung von Nanoemulsionen	32
3.2.1. Dynamische Lichtstreuung	32
3.2.2. Fluoreszenzmessungen	33
3.2.3. Bestimmung des <sup>19</sup> F-Gehalts der PFCs via kombinierte <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-MRT-Bildgebung	33
4. BINDUNG VON MNGPPFCS AN NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	33
4.1. <sup>mNGP</sup> PFC-Bindung an Neutrophile Granulozyten gesunder Mäuse	33
4.2. <sup>mNGP</sup> PFC-Bindung an Matrigel/LPS-stimulierte Neutrophile Granulozyten	34
5. Einfluss der Partikelgröße auf das aktive Targeting von Neutrophilen	34
5.1. Einfluss von LPS auf die CD177-Expression	35
5.2. <sup>19</sup> F-Gehalt der Zellen nach Bindung von <sup>mNGP</sup> PFCs	35
6. Untersuchung der CD177-Expression nach Injektion von <sup>MNGP</sup> PFCs bei Stimulation mit Matrigel/LPS	36
6.1. In situ <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-Bildgebung von Mäusen nach i. v. Injektion von <sup>350nm</sup> PFCs	36
ERGEBNISSE	38
1. Aktives Targeting von murinen Neutrophilen Granulozyten	38
1.1. CD177-Expression im Blut und im Knochenmark	38
1.2. Aufnahme von <sup>mNGP</sup> PFCs durch Immunzellen	41
1.3. Einfluss der Peptidkonzentration auf die Bindung der <sup>mNGP</sup> PFCs	43
1.4. Einfluss inflammatorischer Stimuli auf das aktive Targeting von Neutrophilen Granulozyten mittels	
<sup>mNGP</sup> PFCs	44
1.5. Bindungseigenschaften von freiem mNGP an Neutrophile Granulozyten	45
1.5.1. Fluoreszenzmessung der Peptide	
	46
1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers	46 47
1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers 2. EINFLUSS DER PARTIKELGRÖßE AUF DAS TARGETING	46 47 48
1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers 2. EINFLUSS DER PARTIKELGRÖßE AUF DAS TARGETING 2.1. Partikelanalytik der hergestellten PFCs	46 47 48 48
<ul> <li>1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers</li> <li>2. EINFLUSS DER PARTIKELGRÖßE AUF DAS TARGETING</li> <li>2.1. Partikelanalytik der hergestellten PFCs</li> <li>2.1.1. DLS-Messungen</li> </ul>	46 47 48 48 49
<ul> <li>1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers</li> <li>2. EINFLUSS DER PARTIKELGRÖßE AUF DAS TARGETING</li> <li>2.1. Partikelanalytik der hergestellten PFCs</li> <li>2.1.1. DLS-Messungen</li> <li>2.1.2. Fluoreszenzmessungen</li> </ul>	46 47 48 48 49 49

2.3. Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs an LPS-stimulierte Neutrophile Granulozyten	53
2.4. Ex vivo <sup>19</sup> F-MRT von Neutrophilen Granulozyten	55
2.5. In vivo Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs an Neutrophile Granulozyten	56
2.5.1 In situ kombinierte <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-Bildgebung von LPS-stimulierten Mäusen nach Verabreichung von <sup>350nm</sup> PFCs	59
DISKUSSION	61
Aktives Targeting von Neutrophilen Granulozyten	62
<sup>19</sup> F MRT-basierte Darstellung von Neutrophilen Granulozyten mittels passivem Targeting	63
Aktives Targeting von Neutrophilen Granulozyten über CD177	64
Targeting von Neutrophilen Granulozyten unter entzündlichen Bedingungen	68
Einfluss der <sup>mngp</sup> PFC-Partikelgrößen auf die Darstellung von Neutrophilen	70
Schlussfolgerungen und Ausblick	74
LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	76
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83
TABELLENVERZEICHNIS	84

## Einleitung

#### 1. Initiation und Ablauf von entzündlichen Prozessen

Ein Entzündungsherd ist laut Definition der Ort, an dem eine Inflammation ihren Ausgang genommen hat. Die Entzündung stellt eine Reaktion auf schädigende Einwirkungen (Trauma, Gewebsnekrose, Tumorzellen, Infektionserreger) dar und dient dazu, im Falle einer Infektion, eine weitere Erregerausbreitung zu verhindern und den entstandenen Schaden zu reparieren. Klinisch äußert sich eine Entzündung in Form der klassischen Symptome nach Galen: "*Dolor* (Schmerz), *Calor* (Wärme), *Rubor* (Röte), *Tumor* (Schwellung) sowie *Functio laesa* (Funktionsverlust)<sup>"1</sup>. Eine Entzündung verläuft immer nach einem ähnlichen Muster: nach einer akuten Entzündungsphase folgt die Resolution und anschließend die Heilungsphase, die der Gewebewiederherstellung dient.

Die Pathophysiologie einer Entzündung wird im Folgenden beschrieben. Handelt es sich um einen Erstkontakt mit einem bestimmten Antigen, z. B. mit einem Bakterium, so wird eine primäre unspezifische Immunantwort ausgelöst. Der erste und wichtigste Schritt ist der Kontakt mit Gewebsmakrophagen, die sog. Mustererkennungsrezeptoren, kurz PRRs (pattern recognition receptors), besitzen. Diese erkennen und binden entsprechende molekulare Strukturen auf den Oberflächen von möglichen Pathogenen, die PAMPs (pathogen associated molecular patterns) genannt werden. Wurden die Pathogene erst einmal erkannt, werden diese von den Makrophagen phagozytiert und wenn möglich degradiert und abgetötet. Bruchstücke Proteinen, die von diesen Pathogenen stammen, werden dann von den Makrophagen über MHCI- und MHCII-Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert, wodurch es zu einer Aktivierung von T-Zellen als Bestandteil der sekundären, erworbenen Immunantwort kommt. Zudem werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die vasodilatorisch oder schmerzauslösend wirken. Als weiteren wichtigen Schritt wird das Komplementsystem als Bestandteil der humoralen Immunantwort (lösliche Faktoren) dazu geschaltet. Dieses beginnt mit der Opsonisierung, also der Markierung der Pathogene, was erst einen effektiven Erkennungsprozess und entsprechend auch eine effektive nachfolgende Phagozytose ermöglicht. Zudem setzen Makrophagen Zytokine frei, um weitere Immunzellen zu rekrutieren. Im Rahmen dieser primären Entzündungsreaktion kommt zur Dilatation von Gefäßen, sodass Immunzellen, initial vor allem aber Neutrophile Granulozyten, aus dem Blutstrom in den Infektionsherd migrieren können. Diese Migration wird durch eine Bindung der Zellen an das Gefäßendothel erleichtert, welches im entzündlichen Zustand vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert. Dies wird durch die Interaktion von Selektinen und Integrinen auf den Endothelzellen mit Leukozyten vermittelt. Der Adhäsion folgt die Emigration der Neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe (Diapedese), bis hin zum Ort der Entzündung. Die Richtung der Neutrophilen wird durch einen Chemokingradienten (Chemotaxis) bestimmt, der diese zum Infektionsherd leitet, wo sie aktiv bei der Bekämpfung der Erreger mithelfen<sup>2,3</sup>.

Die ersten Zellen, welche aus dem Blutstrom in den Inflammationsherd einwandern sind, wie oben erwähnt, die Neutrophilen Granulozyten, welche ebenfalls an der Phagozytose von Fremdpartikeln beteiligt sind. Kurz nach den Neutrophilen Granulozyten wandern Monozyten in den Inflammationsherd ein, die sich dort in Makrophagen oder dendritische Zellen (DCs) differenzieren. Diese sind u. a. an der Efferozytose, also der Entfernung apoptotischer Zellen beteiligt, noch bevor die Membran der toten Zellen verletzt und ihr Inhalt in die Umgebung abgegeben wird. Dies trägt maßgeblich zur Resolution, also der Beendigung der Entzündungsreaktion bei. Die dendritischen Zellen prozessieren apoptotische oder fremde Zellen, wandern in die lymphatischen Gewebe aus und primen T-Zellen durch Antigen-Präsentation über MHC-Rezeptoren. Makrophagen verbleiben im Gewebe, können jedoch ihrerseits bereits spezifizierte T-Zellen aktivieren. Dies verstärkt dann wieder die Phagozytosefunktion der Makrophagen selbst. Im späteren Verlauf wandern dann auch Lymphozyten als Bestandteil des erworbenen/adaptiven Immunsystems in den geschädigten Bereich ein. Parallel zur akuten Entzündung - welche wenige Stunden bis einige Tage dauern kann - erfolgt auch eine Reaktion des Bindegewebes. Das zell- und gefäßreiche Umgebungsgewebe verliert nach und nach an Zellen, es kommt zur Wundkontraktion und die Anzahl kollagener Fasern nimmt zu, bis der Schaden, z. B. die Eintrittspforte für die Fremdkörper, behoben wird. Dies ist wichtig, um die Integrität des Gewebes wiederherzustellen und das Eindringen weiterer Erreger zu verhindern, sodass der Wundheilungsprozess fortschreiten kann.

Eine Entzündung kann jedoch auch steril ablaufen, d.h. ohne Beteiligung von Erregern wie wie Bakterien, Viren oder Pilze. Initiatoren einer sterilen Infektionen können nekrotische Zellen sein, die sog. DAMPs freisetzen (DAMP = danger associated molecular pattern), Kristalle (z.B. Cholesterinkristalle), Mineralien (z.B. Aluminiumsalze) oder auch aseptische Verletzungen (z.B. Brüche oder Quetschungen)<sup>4</sup>. So bildet die sterile Entzündung die Grundlage für Erkrankungen wie Atherosklerose, Thrombose oder Myokardinfarkt. Bei der Nekrose von Zellen, bspw. aufgrund von nicht ausreichender Durchblutung, werden DAMPs (*damageassociated molecular pattern*) freigesetzt, welche von Leukozyten im extrazellulären Raum erkannt werden. Diese initiieren dann eine Entzündungsreaktion, die ähnlich zur Reaktion bei Krankheitserregern abläuft, sich aber auf die Beseitigung nekrotischen Gewebes konzentriert<sup>5</sup>.

## 2. Die Rolle von Neutrophilen Granulozyten bei entzündlichen Prozessen

Neutrophile Granulozyten bilden einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems und stellen ca. 50-70 % der zirkulierenden Leukozyten im menschlichen Körper dar. Diese Ratio wird als granulozytäres Blutbild bezeichnet und findet sich auch bei Pferden, Hunden und Katzen<sup>6</sup>. In der Maus hingegen liegt der prozentuale Anteil bei lediglich 10-25 %, während hier die Lymphozyten der dominierende Zelltyp sind. Man spricht hierbei von einem lymphozytären Blutbild<sup>6</sup>. Lange Zeit wurde angenommen, dass Neutrophile Granulozyten nur für sechs bis acht Stunden im Körper zirkulieren, bevor sie ins Gewebe transmigrieren<sup>7</sup>. In einer Studie konnten Pillay et al. jedoch zeigen, dass murine Neutrophile Granulozyten sich sogar bis zu fünf Tage in der Zirkulation befinden können<sup>8</sup>. Mehr als 90% der Neutrophilenpopulation befinden sich im nativen Zustand im Knochenmark, der Leber oder der Lunge<sup>9</sup>. Während der Granulopoese im Knochenmark werden täglich ca. 1 bis  $2 \times 10^{11}$  Neutrophile produziert<sup>10</sup>. In der Zirkulation weisen ausgereifte Neutrophile Granulozyten einen segmentierten Kern sowie zahlreiche Granula und sekretorische Vesikel auf. Der Durchmesser dieser Zellen beträgt in diesem Zustand durchschnittlich 7-10 µm<sup>10</sup>. Eine Störung in der Anzahl oder Funktion der Neutrophilen kann die Immunabwehr erheblich beeinträchtigen. So kann beispielsweise bei der zyklischen Neutropenie oder der septischen Granulomatose beobachtet werden, dass die Betroffenen je nach Schweregrad der genetischen Erkrankung unter Stomatitiden, Lymphadenopathien und Hautabszessen oder aber gar unter Leberabszessen, Pneumonien und Osteomyelitiden leiden<sup>11,12</sup>. Zu den Aufgaben der Neutrophilen Granulozyten gehört die Bekämpfung von Mikroorganismen. Zum einen können sie bakterielle Erreger phagozytieren, zum anderen können sie Granula und Vesikel in den extrazellulären Raum abgeben und damit Mikroorganismen oder Fremdstoffe zerstören und so für den Körper unschädlich machen. Ein spezieller Mechanismus, der vor allem (neben Monozyten/Makrophagen) von Neutrophilen Granulozyten verwendet wird, ist die NETose. NETs bezeichnet *neutrophil extracellular traps*. Diese bestehen aus einem Netzwerk von Chromatin, ergänzt durch antimikrobielle Peptide und Enzyme, und werden durch eine aktive Form des Zelltodes, der NETose, freigesetzt. Die NETs greifen pathogene Strukturen an und fangen sie im Extrazellularraum ein, sodass eine weitere Ausbreitung im Körper unterbunden wird<sup>13,14</sup>. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen, die in ein entzündetes Gewebe einwandern. Tritt eine akute Entzündung ein, erhöht sich durch massive Freisetzung des Reservepools aus dem Knochenmark die Anzahl der im Blut zirkulierenden Neutrophilen sowie durch vermehrte Auswanderung aus dem Blutstrom die Anzahl der in den inflammatorischen Herd eingewanderten Neutrophilen Granulozyten sehr stark.

Laut neusten Erkenntnissen besitzen Neutrophilen Granulozyten einen sehr großen Einfluss auf den Heilungsprozess, indem sie abgestorbene Zellen aufnehmen, aber auch durch Freisetzung von Faktoren, welche die Angiogenese und die Gewebsregeneration stimulieren. Dazu gehören bspw. MMPs (Matrix-Metalloproteinase) oder Wachstumsfaktoren wie VEGF-A (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A). Die Phageozyte von apoptotischen Neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen resultiert in der Freisetzung von TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) und IL-10 (Interleukin-10), welche die Wundheilung fördern<sup>15,16</sup>. Können die Fremdpartikel oder der Krankheitserreger jedoch nicht beseitigen werden, kann sich eine chronischen Entzündung entwickeln<sup>3,17,18</sup>. Die dauerhafte Ansammlung von Neutrophilen im Gewebe, und der damit verbundenen Bildung und Freisetzung von NETs und Proteasen kann zu erheblichen Gewebeschäden führen <sup>9,19</sup>. Interessanterweise konnte aber vor Kurzem von Sabbatini *et al.* (2022) sowie Zhu *et al.* (2021) gezeigt werden, dass NETs einen bisher wenig erforschten positiven Einfluss auf die Wundheilung haben können<sup>16,20-25</sup>.

Das frühe Auftreten und die hohe Zahl der Neutrophilen Granulozyten im Entzündungsherd machen sie für die Visualisierung akuter Entzündungsprozesse mittels molekularer Bildgebung interessant. Eines der wichtigsten bildgebenden Verfahren in der medizinischen Diagnostik und Therapie sowie die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Darstellung von Entzündungsprozessen ist die Magnetresonanztomographie (MRT).

## 3. Darstellung von entzündlichen Prozessen über Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT stellt ein bildgebendes Verfahren dar, welches in der Klinik sehr häufig angewandt wird. Es eignet sich besonders gut zur Weichgewebsdiagnostik. Ein Vorteil dieser Technik ist, dass sie keiner radioaktiven Strahlung bedarf. Stattdessen wird bei der MRT Gebrauch von magnetischen Kräften gemacht. Am häufigsten werden in der MRT die körpereigenen Wasserstoffatome (<sup>1</sup>H) dargestellt. Diese sind in der Summe ungeladen, da sie im Kern nur über ein Proton und in ihrer Elektronenhülle über ein Elektron verfügen, welches um den Kern kreist. Das Proton besitzt einen Spin, also einen Drehimpuls (Kernspin) um die eigene Achse, welches die Grundlage der Bildgebung darstellt. Dieser Kernspin generiert ein kleines magnetisches Moment, das durch äußere magnetische Kräfte beeinflusst werden kann. Während einer Untersuchung wird ein starkes Magnetfeld angelegt. Dieses bewirkt, dass die Kernspins in derselben Achse ausgerichtet werden, und zwar längs des Magnetfeldes - was normalerweise auch der Körperachse entspricht. Die Achsen der Spins können entweder parallel zu dieser Achse ausgerichtet sein und beschreiben dann einen energieärmeren Zustand, oder aber antiparallel stehen. Es entsteht somit ein Längsvektor in die energieärmere, parallele Richtung. Die Protonen kreisen zudem alle um die Längsachse des Magnetfeldes. Diese Bewegung wird als Präzession bezeichnet. Die Frequenz der Bewegung wird durch die Larmor-Frequenz beschrieben. Sie steigt bei einem höher angelegten Magnetfeld. Protonen präzedieren mit einer Frequenz von 42.5 MHz/Tesla. Sind die Kerne entlang der Magnetlängsachse ausgerichtet, kann durch einen Impuls im Radiofrequenzbereich, welcher in seiner Frequenz der Larmor-Frequenz entsprechen muss, eine Quermagnetisierung erzeugt werden. Einige Kerne richten sich anschließend in den energetisch höheren antiparallelen Zustand auf. Parallele und antiparallele Zustände heben sich in ihrer Wirkung gegenseitig auf, wodurch die Längsmagnetisierung aufgehoben wird. Die Protonen präzedieren nun gemeinsam und synchron um das angelegte Magnetfeld. Es entsteht eine Quermagnetisierung. Nach Unterbrechung des Hochfrequenzimpulses fallen die Kerne wieder zurück in ihre ursprünglichen Zustände. Der Quervektor nimmt wieder ab und der Längsvektor nimmt zu. Die Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischen Feld und den Spins nennt man magnetische Resonanz<sup>26</sup>. Die Dauer bis 63 % der Protonen die Längsmagnetisierung wieder erreicht haben wird als T1-Zeit bezeichnet. Die T2-Zeit gibt den Zeitpunkt an, an dem 63 % der Kernspins in Querrichtung relaxiert sind. Anhand der T1- und T2-Zeiten können unterschiedliche Gewebearten in Abhängigkeit von den Relaxationseigenschaften der H-Protonen unterschieden werden<sup>27-29</sup>.

## 3.1. Kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Magnetresonanzbildgebung

Durch die hohe Konzentration von <sup>1</sup>H-Kernen im Organismus lassen sich über diesen Atomkern sehr detaillierte Bilder erzeugen. Allerdings ist durch das ubiquitäre Vorhandensein von <sup>1</sup>H keine Spezifität für eine bestimmte Zellpopulation gegeben. Daher lassen sich Entzündungsprozesse nur indirekt z. B. aufgrund eines veränderten Wassergehalts im Gewebe (Ödembildung) darstellen. Um die Detektion von Entzündungen zu erleichtern, wurden verschiedene Kontrastmittel entwickelt. Grob werden positive und negative Kontrastmittel unterschieden. Positive Kontrastmittel führen zu einer Signalerhöhung im gesunden Gewebe in der T1-Wichtung, während negative Kontrastmittel das T2-gewichtete Signal abschwächen<sup>30</sup>. Die gängigsten MRT-Kontrastmittel zur Darstellung entzündlicher Prozesse basieren auf Gadolinium (Gd)-Komplexen. Gd ist ein chemisches Element, welches zur Gruppe der Lanthanoide gehört. Trotz seiner breiten Anwendung wird es stark diskutiert, da es in nierenkranken Patienten eine nephrogene systemische Fibrose (NSF) induzieren kann. Zudem verbleibt es nach neueren Erkenntnissen noch lange im Gehirn und hat dort womöglich negative Effekte<sup>31,32</sup>. Gd-Komplexe treten an Orten mit vermehrter Endothelpermeabilität ins perivaskuläre Gewebe aus und lassen sich dort aufgrund einer Reduktion der T1- und T2-Zeiten darstellen. Ein weiteres häufig eingesetztes Kontrastmittel, das der Markierung von phagozytierenden Zellen dient, sind SPIOs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles). SPIOs werden von Phagozyten aufgenommen und erzeugen durch die magnetischen Eigenschaften der Eisenoxidkristalle Inhomogenitäten im Magnetfeld, die zu einer lokalen Signalauslösung führen (negatives Kontrastmittel). Sie zeigen eine hohe Empfindlichkeit und demnach ein hohes Maß an Reaktion auf das Magnetfeld. Der Nachteil dieser Substanz ist

jedoch die Schwierigkeit der Interpretation der erhobenen Daten, da die Inhomogenitäten des Magnetfeldes nicht von Inhomogenitäten anderer Ursache unterschieden werden können, sodass zeitaufwändige Vorher-Nachher-Aufnahmen angefertigt werden müssen<sup>33-35</sup>.

Aufgrund dessen macht man sich in der MRT auch andere NMR (nuclear magnetic resonance)sensitive Kerne zu Nutze. Der Ansatz unserer Arbeitsgruppe beruht auf der Bildgebung mittels Fluor. Fluor ist ein chemisches Element aus der Gruppe der Halogene, welches natürlich vorkommt. Es hat die höchste Elektronegativität unter allen Elementen, sodass eine Verbindung von Kohlenstoff mit Fluor demnach eine der stärksten Bindungen zwischen Atomen darstellt. Bis dato ist noch kein Enzym nachgewiesen, welches diese Bindung spalten kann<sup>36</sup>. Das Isotop <sup>19</sup>F ist stabil und zerfällt nicht. Zudem fehlt Fluor nahezu vollständig im menschlichen Körper, was in der MRT-Bildgebung zu einem hintergrundfreien Signal führt, wenn <sup>19</sup>F-Atome mithilfe eines entsprechenden Transportmoleküls (Carrier), bspw. einer Lipidemulsion vor einer Untersuchung intravenös injiziert wird und sich lokal anreichert<sup>37</sup>. Um eine anatomisch genaue Darstellung der injizierten fluorhaltigen Substanzen im Körper zu ermöglichen, wird im ersten Schritt eine klassische anatomische <sup>1</sup>H-Magnetresonanzaufnahme durchgeführt. Anschließend wird ortsgleich das Fluorsignal detektiert und die Bilder werden überlagert. Dies lässt eine exakte Lokalisation des Fluorsignals zu. Um eine hohe Dichte an Fluor in der zu injizierenden Substanz zu gewährleisten, werden in unserer Arbeitsgruppe so genannte Perfluorkarbone verwendet.

#### 4. Perfluorkarbone und Perfluorkarbon-Nanoemulsionen

Perfluorkarbone sind kohlenstoffhaltige Verbindungen, in denen alle Sauerstoffatome durch Fluoratome ersetzt wurden. Sie können in linearer oder zyklischer Form vorkommen. Sehr kurzkettige Perfluorkarbone sind gasförmig, längerkettige als geruchslose Flüssigkeiten mit einer höheren Dichte als Wasser und langkettige als feste Verbindungen. Letztere werden z. B. bei der Herstellung von Teflon eingesetzt<sup>38</sup>. Sie haben eine Dichte von bis zu 2 g/ml, sind chemisch inert, nicht toxisch und bis dato ist noch kein Enzym nachgewiesen, welches die Bindung zwischen Kohlenstoff und Fluor spalten kann. Perfluorkarbone haben eine ausgeprägte Fähigkeit, Sauerstoff zu binden und Kohlenstoffdioxid exzellent zu lösen, weshalb ihr Einsatz als Sauerstofftransporter und -detektoren schon seit Längerem bekannt ist. Lineare Perfluorkarbone- wie das Perfluoroktylbromid (PFOB) erzeugen keine gesundheitlichen Schäden und wurden in der Medizin bereits als synthetische Sauerstofftransporter angewandt<sup>39</sup>. Zudem wurden Perfluorkarbone auch schon als Blutersatzstoffe und zur flüssigen Beatmung eingesetzt<sup>40,41</sup>.

Zur Anwendung in der MRT-Bildgebung können verschiedene Perfluorkarbone genutzt werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Perfluorkronenether (PFCE) gearbeitet. PFCE hat 20 Fluoratome in chemisch äquivalenter Umgebung und weist daher nur eine einzigen MRT-Resonanz auf. Sie sind fluorophil, gleichzeitig hydrophob und lipophil, weshalb die Perfluorkarbone zur biologischen Nutzung emulgiert werden müssen<sup>42</sup>.

Bei einer Emulsion handelt es sich um eine Dispersion zweier ineinander nicht löslicher Komponenten, wie z. B. Öl und Wasser. Je nach innerer und äußerer Phase unterscheidet man Öl-in-Wasser- (o/w) und Wasser-in-Öl- Emulsionen (w/o). Fügt man ein Tröpfchen Wasser in ein Glas voller Öl, so bildet sich eine w/o-Emulsion. Bei wenig Öl in viel Wasser entsteht im Gegensatz dazu eine o/w-Emulsion<sup>43</sup>. Um eine stabile Emulsion herzustellen, bedarf es eines Emulgators. Emulgatoren sind Verbindungen, welche amphiphil sind, d.h. sowohl eine lipophile als auch eine hydrophile Phase besitzen. Die Bancroftsche Regel besagt, dass die äußere Phase einer Emulsion, also das Dispersionsmittel, von der Flüssigkeit gebildet wird, die den Emulgator besser löst oder diesen besser benetzt44,45. Die für diese Arbeit hergestellten Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) wurden mit von der FDA (united states food and drug administration) bereits für den parenteralen Einsatz zugelassenen biologischen Phospholipiden (Lecithine) emulgiert. Sie bilden in einem hydrophilen Milieu Mizellen. Die hydrophilen Köpfe der Lipide zeigen dabei in Richtung des Wassers und die lipophilen Enden vereinigen sich zentral und bilden eine Phase, in der sie weitere lipophile Produkte, z. B. die PFCs, aufnehmen können. So können die PFCs in hydrophilen Flüssigkeiten, wie z. B. im Blut, transportiert werden. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der in der Arbeit verwendeten PFCs.



Abb. 1: Schematische Darstellung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs). Phospholipide bilden die äußere Phase der Emulsion. Perfluorkarbone z.B. in Form des Perfluor-15-kronenethers (PFCE) stellen die innere Phase der Emulsion dar.

## 5. Targeting von Zellen

Als Zelltargeting bezeichnet man den Vorgang der direkten Ansteuerung von Zellen im Organismus, meist durch Nanopartikel oder Liposomen. Im Bereich der Pharmakologie wird dieses Prinzip schon länger im Rahmen des *"Drug Targetings"* verfolgt. Dies stellt den gezielten Transport eines Medikamentes zu einem bestimmten Gewebe oder zu einer bestimmten Zellart dar, um dort freigesetzt zu werden und seine Wirkung zu entfalten. Es werden verschiedene Targetingformen unterschieden. Ganz grundsätzlich unterteilt man in das passive und das aktive Targeting<sup>46,47</sup>.

## 5.1. Passives Zelltargeting

Beim passiven Zelltargeting werden Partikel unspezifisch von phagozytisch aktiven Zellen wie den Monozyten und Makrophagen und in geringem Maße auch den Neutrophilen Granulozyten aufgenommen. Diesen Effekt macht man sich insbesondere zur Darstellung von Entzündungsprozessen zunutze, bei denen im Gewebe ein hoher Gehalt an phagozytischen Immunzellen vorliegt. Zudem wird das Endothel im entzündlichen Areal durchlässiger und Partikel treten ins Gewebe ein. Erstmalig wurde dieser Effekt als *enhanced permeability and*  *retention effect* (EPR-Effekt) im Jahre 1986 von Matsumura und Maeda<sup>48</sup> im Rahmen der Tumorforschung beschrieben. Sie fanden heraus, dass die Gefäßpermeabilität im Tumorgewebe pathologisch erhöht und der lymphatische Abfluss gleichzeitig behindert war. So war eine Anreicherung von Makromolekülen, wie Polymeren und Proteinen im Tumorgewebe möglich. Dies war der Grundstein für die medikamentöse Tumortherapie<sup>48,49</sup>. Auch im Rahmen entzündlicher Prozesse ist der EPR-Effekt beschrieben. Er bewirkt auch hier eine passive Akkumulation von makromolekularen Partikeln im inflammatorischen Gewebe<sup>50</sup>.

Das beschriebene passive Zelltargeting ist stark abhängig von der Halbwertszeit der Partikel in der Blutstrombahn. Diese ist entscheidend dafür, ob die Partikel den Ort der Entzündung überhaupt erreichen können oder z. B. bereits zuvor in den makrophagenreichen Organen des retikuloendothelialen Systems (RES) abgefangen werden.

Die Machbarkeit des passiven Zelltargetings mittels phagozytierender Zellen für die Fluorbildgebung wurde erstmals 2008 von Flögel *et al.* nachgewiesen. In der Studie dieser Autoren wurde in zwei Mausmodellen eine lokale Entzündung in Form eines Myokardinfarkts oder einer zerebralen Ischämie ausgelöst. Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von PFCs, während nachfolgend durch Aufnahme von <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-Bildern am MRT die Einwanderung der Monozyten/Makrophagen in die entzündeten Areale gezeigt werden konnte. Dass dieses Signal in der Tat von Monozyten/Makrophagen getragen wurde, konnte mittels histologischer und durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen werden<sup>37</sup>.

## 5.2. Aktives Zelltargeting

Anders als beim beschriebenen passiven Targeting erfolgt beim aktiven Zelltargeting eine direkte Ansteuerung bestimmter Zellen. Es werden Liganden eingesetzt, die an spezifische, charakteristische Oberflächenrezeptoren der gewünschten Zielzellen binden. Diese werden an die Emulsionen gekoppelt und mithilfe der spezifischen Emulsionen können Zielzellen anschließend angesteuert werden. Beispielhaft kann an dieser Stelle die Detektion von frühen venösen Thromben in Mäusen erwähnt werden. Hierzu wurden PFCs mit einem Peptid aus dem  $\alpha$ 2-Antiplasmin ( $\alpha$ 2AP) funktionalisiert, welches als Inhibitor der Fibrinolyse fungiert und im Körper durch den Faktor XIIIa (FXIIIa) mit Fibrin vernetzt wird. Nach intravenöser Injektion

der  $\alpha$ 2AP-PFCs und simultaner Aufnahme von <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-MRT-Bildern konnte gezeigt werden, dass diese PFCs spezifisch an Thromben gebunden haben. Auf diese Weise konnten selbst kleinste Thromben mit einem Durchmesser von < 0.8 mm detektiert werden. Bestätigt wurden die Bindungen durch histologische Untersuchungen des thrombotischen Materials<sup>51</sup>.

Für ein aktives Targeting ist es von entscheidender Bedeutung Liganden zu identifizieren, welche exklusiv von einer einzelnen Zellpopulation gebunden werden, um so spezifisch diese Zellpopulation markieren zu können. Ein klassischer Marker muriner Neutrophiler Granulozyten ist Ly6G, welches allerdings bei Antikörperbindung zu einer Zellaktivierung führt, die sich in der vermehrten Ausschüttung von Alpha-Interferonen, also Proteinen mit immunstimulierender Wirkung und einer Modulation des Migrationsverhaltens, äußert<sup>52</sup>.

## 6. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollen Peptide, die spezifisch an die Zelloberfläche von murinen Neutrophilen Granulozyten binden, an Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) gekoppelt werden, um die Visualisierung von Neutrophilen Granulozyten via <sup>19</sup>F-MRT zu ermöglichen. Durch das natürliche Fehlen von <sup>19</sup>F sowohl beim Menschen als auch in der Maus könnte auf diese Weise eine hintergrundfreie Darstellung der Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe erfolgen.

Im praktischen Teil der Arbeit soll zunächst die Expression von CD177 auf murinen Blutzellen untersucht werden, um herauszufinden, ob dieser Rezeptor für Neutrophile spezifisch ist. Im nächsten Schritt sollen dann PFCs mit Peptiden gegen CD177 funktionalisiert und deren Eigenschaften mittels DLS, Fluoreszenzmessungen und <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT charakterisiert werden. Im weiteren Verlauf sollte *ex vivo* die Bindung dieser Partikel an native und stimulierte Neutrophile Granulozyten untersucht werden, um schließlich sowohl Targetingvorgänge in gesunden Systemen und das Vorliegen eines Entzündungsprozesses *in vivo* zu untersuchen. Zudem sollen verschiedene Parameter, die das Targeting beeinflussen können, untersucht werden. Hierzu zählen z. B. die Peptidkonzentration innerhalb der Emulsionen und die Größen der hergestellten PFCs. Das zweite Ziel – neben der Etablierung des Neutrophilen Targetings – ist die Optimierung, um die Markierung von Neutrophilen Granulozyten qualitativ und quantitativ zu verbessern.

## Materialien

## 1. Geräte

## Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Analysewaagen	Ohaus Europe	PA214
	(Greifensee, Schweiz)	
	Kern (Balingen,	PA214
	Deutschland)	
Autoklav	F. & M. Lautenschläger	5169
	(Köln, Deutschland)	
Durchflusszytometer	BD Biosciences (San	FACS CANTO II
	Jose, USA)	
	BD Biosciences (San	LSR FORTESSA
	Jose, USA)	
Eismaschine	Scotsman (Milan, Italy)	AF20
Fluoreszenzspektroskop	Caliper LifeSciences	IVIS Lumina II
	(Mainz, Deutschland)	
Hochdruckhomogenisator	Microfluidics Corp,	LV1 – UL – CE
	Westwood, MA, USA	
Inkubator	Thermo Fisher	Heracell 150 i
	(Rockford, USA)	
Dispergiergerät	IKA-Werke (Staufen,	Ultra Turrax TP 18/10
	Deutschland)	
Photonenkorrelationsspektrometer	Microtrac	Zetatrac
	(Montgomeryville,	
	USA)	
MRT-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten,	45mm-Quadratur
	Deutschland)	

MRT-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten,	9.4 Tesla 400MHz
	Deutschland)	Bruker AVANCE <sup>III</sup>
		Widebore
Pipetten	Eppendorf (Hamburg,	Research
	Deutschland)	
Präparierwerkzeuge	Roth (Karlsruhe,	
(Schere, Pinzette, Sonde)	Deutschland)	
Reagenzglas-Vortex-Schüttler	VWR International	Vortex-Schüttler
	(Darmstadt,	
	Deutschland)	
	neoLab (Heidelberg,	Vortex-Genie 2
	Deutschland)	
Rotator	Miltenyi Biotec GmbH	MACSmix Tube Rotator
	(Bergisch Gladbach)	
Schaukelplattform	VWR International	Rocking Platform
	(Darmstadt,	
	Deutschland)	
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin,	Sonorex RK 100 H
	Deutschland)	
Analysewaage	Ohaus Corporation	Pioneer
	(Parsippany, USA)	
Zentrifugen	Beckman Coulter (Brea,	Allegra X-30R
	USA)	
	Eppendorf (Hamburg,	5415R
	Deutschland)	
	Thermo Fisher	Heraeus Megafuge 16R
	(Rockford, USA)	
	Thermo Fisher	Heraeus Biofuge Primo P
	(Rockford, USA)	

## 2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), Cellstar
Einwegspritzen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
1 ml, 2 ml, 10 ml	
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Flügelpunktionskanüle/	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Butterfly (27 G)	
Heparin-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), LH 170
Klebeband	Bio-Rad (Düsseldorf, Deutschland)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg, Deutschland)
Insulinspritzen U-100	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
(Omnifix-F)	
Reagiergefäße nach Eppendorf	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
(250 µl, 500 µl, 1.5 ml, 2 ml)	
Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml,	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
25 ml, 50 ml)	
Zellsieb, EASYstrainer	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
(100 µm)	
Zentrifugenröhrchen/ Falcons/	Greniner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Polypropylenröhrchen	
(15 ml, 50 ml)	
Aufziehkanüle 18 G	Becton Dickinson (Fraga, Spanien)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien mit Herstellernennung

## 3. Puffersysteme, Medien und Chemikalien

Tabelle 3: Puffersysteme, Medien und Chemikalien mit Herstellernennung

Puffer, Medien und	Hersteller	
Chemikalien		
8-Arm-PEG-Anker	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)	

Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Dimethyl			
	sulfoxide			
DMEM	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Dulbecco's			
	Modified Eagle's Medium			
DSPE-mPEG <sub>2000</sub>	Avanti lipids (Alabama, USA)			
DSPE-mPEG2000-Maleimid	Avanti lipids (Alabama, USA)			
Heparin-Natrium 5.000 i.E./ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)			
Isofluran	Actavis GmbH (Wien, Österreich)			
LPS	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Salmonella			
	typhimurium			
Lyse-Puffer (pH 7.4)	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke			
	(Düsseldorf, Deutschland), isotonische			
	Ammoniumchlorid-Lösung			
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec (Gladbach, Deutschland)			
Matrigel Matrix	Corning (Bedford, USA)			
Pentobarbital-Natrium	WDT (Garbsen, Deutschland)			
300 mg/ml				
Perfluorkronenether	ABCR (Karlsruhe, Deutschland)			
PFA (4 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), ROTI Histofix			
Phosphat-Glycerol-Puffer	Eigene Herstellung: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3 mM), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7			
(pH 7.4)	mM), Glycerol (2.5 % m/V), MilliQ Wasser (ad 1 l)			
Phospholipid (Lipoid SS75)	Lipoid AG (Ludwigshafen, Deutschland)			
Rhodamin	Avanti lipids (Alabama, USA)			
DMEM	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Dulbecco's			

## 4. Antikörper

 Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Reaktivität	Firma
CD11b	PE	M1/70	murin	BD Pharmingen
CD177	APC	Y127	murin	BD Pharmingen
CD45	PE-Cy7	30-F11	murin	BD Biosciences
DAPI	Pacific blue	-	-	Sigma Life
				Science
Ly6G	PE-Cy5.5	1A8	murin	BD Biosciences

## 5. Peptide

#### **Tabelle 5: Verwendete Peptide**

Peptide	Hersteller	Peptidsequenz
mNGP (Peptid gegen mCD177)	Genaxxon	DFYKPMPNLRIT-GGG-C
mCon (Kontrollpeptid)	Genaxxon	SLAMFLTHSPEP-GGG-C

Die Peptidsequenzen können in drei Abschnitte gegliedert werden, welche anhand des mNGP in der obigen Tabelle farblich hervorgehoben wurden. Der erste Abschnitt (rot) stellt die Bindungsstelle für die Bindung an das CD177-Molekül dar. Anschließend folgt ein Spacer (blau), in Form einer dreifachen Glycin-Sequenz. Der Spacer als Abstandshalter verleiht dem Peptid mehr Flexibilität. Das Ende (grün) wird durch ein Cystein markiert, was über seine freie Sulfhydrylgruppe zur Kopplung an PFCs verwendet werden kann.

## 6. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden 10 bis 12 Wochen alte männliche Mäuse der Linie C57BL/6J verwendet. Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den nationalen Richtlinien durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV, Nordrhein-Westfalen, Deutschland, Aktenzeichen 81-02.04.2020.A290) genehmigt. Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden von Janvier bezogen. Sie waren in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben des

Universitätsklinikums Düsseldorf (ZETT, Düsseldorf, Deutschland) im 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus in Eurostandard Typ I SL Käfigen auf Standardeinstreu untergebracht, wurden mit einer Standard-Chow-Diät gefüttert und erhielten Leitungswasser ad libitum.

## 7. Software

Im Rahmen der Arbeit wurden die Programme Microsoft Word 2019, Microsoft Excel 2019, Microsoft Powerpoint 2019 sowie EndNote X9 verwendet. Die statistische Auswertung und die Darstellung der Grafiken erfolgte mit Hilfe des Programms Origin sowie mithilfe von Numbers (Mac). Die durchflusszytometrischen Versuche wurden zudem mit FlowJo ausgewertet. Daten und Bilder, welche aus MRT-Messungen gewonnen wurden, konnten mit Hilfe des Programms ParaVision 5.1 generiert und ausgewertet werden. Rohdaten aus DLS- sowie Fluoreszenzmessungen wurden direkt in Microsoft Excel 2019 aufgenommen und manuell ausgewertet.

## Methoden

## 1. Präparation der Mäuse

#### **1.1. Matrigelimplantation**

Um den Einfluss eines Entzündungsherdes auf die Anzahl und das Verhältnis der Immunzellen im Blut, aber auch im Entzündungsherd selbst zu untersuchen, eignen sich sogenannte Matrigele, die mit LPS versetzt sind. Bei Matrigelen handelt es sich um extrazelluläre Matrix, welche aus Mäusen der Sarkomzellinie *Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)* stammen. Matrigele sind bei tiefen Temperaturen um 4°C flüssig. Bei Implantation und dem damit einhergehenden Kontakt mit dem warmen Körper der Tiere werden sie jedoch kolloidartig<sup>53,54</sup>.

Hierfür wurde zunächst das zu implantierende Matrigel/LPS hergestellt. Das LPS wurde in einem Verhältnis von 1:3 zum vorhandenen Matrigel angesetzt. Wichtig ist dabei, dass das Gemisch stets auf Eis gelagert wird, da es sonst bereits vor der subkutanen Injektion in den Nacken fest wird. Für die Dauer der Implantation wurden die Mäuse zunächst in einer Narkosekammer (3 Vol % Isofluran in Druckluft) narkotisiert. Die Narkose wurde anschließend mit 2 % Isofluran in Druckluft über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Die Implantation fand auf einer auf 37 °C geheizten Wärmeplatte statt. Die Mäuse wurden auf den Bauch gelegt und die Haut am Nacken der Tiere wurde mit den Fingern gespannt. Anschließend wurden die Haare im Bereich des Nackens in einem 4 cm<sup>2</sup> großen Bereich mit einem elektrischen Rasierer entfernt und die Haut konnte mit einer feinen Pinzette leicht angehoben werden, sodass das Einspritzen in den subkutanen Raum mittels einer U-100 Insulinspritze erleichtert werden konnte. Hierauf wurden 50  $\mu$ l Matrigel mit 1  $\mu$ g/ $\mu$ l LPS gespritzt. Zum Aufwachen wurden die Mäuse in einem sauberen Käfig unter einer Wärmelampe gehalten.

## **1.2. Isolation von murinen Immunzellen**

#### 1.2.1. Blutentnahme über die Schwanzvene

Für sehr geringe Mengen Blut (ca. 10 - 50  $\mu$ l) eignet sich die Blutentnahme über die Schwanzvene. Die entsprechende Maus wurde hierbei in einer Zwangsröhre platziert. Anschließend wurde die Schwanzspitze mit einem Skalpell angeritzt. Wenige Tröpfchen des austretenden Blutes konnten mit Hilfe der Kapillarwirkung in ein schmales Gefäß gezogen werden. Im Anschluss wurde ca. eine Minute lang Druck auf die eröffnete Stelle ausgeübt, sodass ein weiterer Blutverlust ausgeschlossen werden konnte. Anschließend wurde die Maus wieder in den Käfig verbracht.

#### 1.2.2. Punktion der Vena cava inferior

Über die Punktion der Vena cava inferior können weitaus größere Mengen Blut entnommen werden. Diese Methode sollte jedoch nur in Betracht gezogen werden, wenn andere Vorgehensweisen ausgeschlossen sind, da die Mäuse diesen invasiven Eingriff nicht überleben. Die Maus wurde hierfür vorerst für wenige Sekunden mit Isofluran narkotisiert, sodass nach Aussetzen der Stellreflexe in Ruhe Heparin sowie Pentobarbital injiziert werden konnten. Die Maus wurde hierbei schmerzfrei getötet. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (fehlende Zwischenzehenreaktion) konnte mit der Präparation der Vena cava inferior begonnen werden. Die Maus lag dabei mit dem Rücken auf einem kleinen Präpariertisch und wurde an ihren Extremitäten fixiert. Die Laparotomie erfolgte in Längsachse bis hin zum Brustkorb. Um an die große untere Hohlvene zu gelangen, mussten zunächst die inneren Organe zur Seite geschoben werden. War dies erfolgt, wurde unter direkter Sicht auf das Gefäß über eine Butterfly-Kanüle eine Punktion der Vena cava inferior durchgeführt. Das Blut konnte anschließend vorsichtig entnommen werden.

#### 1.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark

Für die Gewinnung von Knochenmark wurde ein zentrifugationsbasiertes Protokoll von Amend *et al.* verwendet<sup>55</sup>. Dafür musste die Maus zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet werden. Anschließend wurden die Beine mit Femur, Tibia und Fibula freipräpariert. Die Muskulatur wurde mit Hilfe eines Tuches abgestreift und die gewonnenen Knochenteile wurden

in einem 0.5 ml Eppendorf, welches vorab am Boden durch eine 18 G große Aufziehkanüle perforiert wurde, aufgenommen. Diese kleineren Reaktionsgefäße wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße gestellt und für 30 Sekunden bei etwa 10.000 x g zentrifugiert. Dadurch gelangte das Knochenmark aus den Knochenproben durch die Perforation der kleineren in die größeren 1.5 ml Auffang-Reaktionsgefäße. Die entstandenen Pellets wurden mit Hilfe von Lysepuffer in 15 ml Falcons überführt.

#### 1.2.4 Aufbereitung des entnommenen Blutes und Knochenmarks

Die entnommenen Blut- und Knochenmarkproben wurden stets in 15 ml Falcons überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Falcons mit Erythrozytenlysepuffer auf 15 ml aufgefüllt. Nach einer Lysezeit von 10 Minuten auf Eis konnte das Blut bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nach diesem Prozess lagern sich die festen Zellbestandteile am Boden der Gefäße ab und bilden ein weißes Pellet. Es galt dann, den Überstand vorsichtig abzusaugen. Befanden sich weiterhin Erythrozyten im oder um das Pellet herum, wurde der Lyse- und Zentrifugationsprozess wiederholt, bis die Probe rein von Erythrozyten war und ein klares weißes Pellet am Boden des Falcons zurückblieb. Das Knochenmark wurde final über ein 100 µm Zellsieb gegeben, um eventuell vorhandenen Zellschrott zu entfernen.

#### 1.3. Isolation von Zellen aus s.c. implantieren Matrigelen

Die Entnahme der zuvor implantierten Matrigele (s. 1.1.) erfolgte nach Tötung der Maus und 24 Stunden nach Implantation durch zervikale Dislokation. Die Maus wurde auf den Bauch gelegt und die Haut wurde im Bereich des Nackens vorsichtig abpräpariert. Danach wurde die Hautinsel mit der bindegewebigen Innenseite nach oben auf einer Styroporplatte aufgespannt und das Matrigel wurde mit feinem Präparierwerkzeug von der Kutis abgehoben.

Für die folgende Zellisolation wurde das herauspräparierte Matrigel auf ein 100  $\mu$ m Zellsieb gegeben und mit Hilfe des Kolbens einer Einwegspritze durch dieses gerieben. Es wurde mit 1 ml DMEM nachgespült. Die herausgelösten Zellen wurden in einem 50 ml-Falcon aufgefangen. Waren noch Erythrozyten sichtbar (rotes Pellet nach Zentrifugation bei 500 x g), wurden die Zellen anschließend noch lysiert.

#### 1.4. Intravenöse Injektion von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)

Um die PFCs in die Blutbahn einzubringen, wurden diese intravenös über die seitliche Schwanzvene injiziert. Hierfür wurden die Mäuse in einer Narkosekammer mit 3 Vol % Isofluran in Druckluft betäubt. Die Narkose wurde anschließend mit 2 % Isofluran in Druckluft über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Während der Narkose wurden die Mäuse auf einer auf 37 °C gewärmten Wärmeplatte gelagert. Anschließend wurde der Schwanz durch Aufkleben auf die Wärmeplatte erwärmt, sodass sich die Gefäße weiten konnten. Nach Fixation der Maus mit Klebeband, wurde durch eine feine Insulinspritze mit einem Durchmesser von 29 G eine vorsichtige Punktion einer der lateralen Schwanzvenen vorgenommen. War die Punktion erfolgreich, konnten die PFCs langsam injiziert werden. Bei einer paravenösen Injektion sammelt sich die Flüssigkeit im Gewebe. Hierauf ist zu achten und die Injektion ist in einem solchen Fall unverzüglich abzubrechen, um den Tieren keinen Schaden und keine vermeidbaren Schmerzen zuzufügen. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Tiere in einen sauberen Käfig verbracht, in dem sie unter einer Rotlichtlampe erwachen konnten.

## 2. Oberflächenexpression von CD177 auf murinen Immunzellen

## 2.1. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, um Zellsuspensionen schnell zu analysieren. Häufig wird der Begriff FACS (*fluorescence activated cell sorting/ scanning*) synonym hierzu verwendet, jedoch handelt es beim FACS eigentlich um Durchflusszytometrie. Die Funktionsweise der Durchflusszytometrie beruht auf der Anwendung von Laserlicht. Die Zellsuspension wird zuerst durch hydrodynamische Fokussierung gebündelt, sodass ein feiner Flüssigkeitsstrahl entsteht, welcher vereinzelte Zellen enthält, die mit einigem Abstand einen Laserstrahl passieren. Bei der Passage durch den Laserstrahl erzeugen die Zellen ein charakteristisches Streulicht, welches von empfindlichen Detektoren aufgezeichnet und zur bildlichen Darstellung über einen Computer umgerechnet wird. Wurden die Zellen vorher mit farbstoffgebundenen Antikörpern, Peptiden, Emulsionen oder Ähnlichem markiert, werden die Farbstoffe durch weitere Laser zur Fluoreszenz angeregt und auch diese Informationen können detektiert und visualisiert werden.

Das Streulicht gibt Informationen über die Größe und Granularität der Zellen. Dabei unterscheidet man zwischen FSC (*forward* scatter), also Vorwärtsstreulicht und SSC (*sideward* scatter), also Seitwärtsstreulicht. FSC stellt das Volumen der Zellen und SSC die Granularität, die Größe und die Struktur des Zellkerns und die Menge der Vesikel im Zytoplasma dar. Zellen des Blutes lassen sich durch FSC und SSC bereits recht gut unterscheiden. Mit Hilfe weiterer Laser kann die Bindung fluoreszenzmarkierter Liganden an die zu untersuchenden Zellen untersucht werden. Das in diesen Wellenlängen emittierte Licht gibt also Aufschluss über die Expression von Oberflächenantigenen an den Zellen. Wird eine ausreichend große Zellzahl verwendet, gibt die Durchflusszytometrie auch Hinweise auf die quantitative Verteilung der Zellen mit bestimmten Oberflächenmolekülen. Umgekehrt kann über die Quantifizierung des emittierten Lichtes ein Rückschluss auf die Dichte der Oberflächenmoleküle auf einer einzelnen Zelle gezogen werden. Die üblichen FACS-Geräte unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl ihrer Laser. Je mehr Laser ein Gerät aufweist, desto mehr Farbstoffe können für die Analysen an die Zellen gekoppelt werden und desto mehr Oberflächenstrukturen können untersucht werden.

Abbildung 2 zeigt beispielhaft eine schematische Zelltrennung murinen Blutes nach einer durchflusszytometrischen Analyse ohne Anwendung von Antikörpern.



Abb. 2: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse muriner Blutzellen. Die Abbildung zeigt schematisch, wie sich verschiedene Leukozyten allein anhand von Größe und Granularität voneinander unterschieden lassen. Während die Granulozyten ein großes Zellvolumen und einen größeren Kern und bei hoher Granularität besitzen, Monozvten sind und allem vor Lymphozyten kleinvolumiger und haben kleinere/einfachere Zellkerne. Diese Eigenschaften ermöglichen eine grobe Trennung der Populationen auch ohne Verwendung zellspezifischer Antikörper.

#### 2.1.1. Zellzählungen mittels Durchflusszytometrie

Oft ist es notwendig, für Versuche eine initial vorbestimmte Zellzahl zu verwenden, um zu gewährleisten, dass die Bedingungen bei Wiederholungsversuchen gleichbleiben und mehrere durchgeführte Versuche miteinander vergleichbar sind. Auch hierfür kann man sich der Durchflusszytometrie bedienen. Zellzählungen können sowohl an Blut- als auch an Knochenmarkszellen erfolgen.

Für Zählungen wurden die Zellen nach der Aufreinigung entsprechend vorbereitet: Das Erythrozyten-freie Pellet wurde in 1000  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen. Für die Zählung wurden der Suspension 10  $\mu$ l entnommen, welche mit 90  $\mu$ l MACS-Puffer auf 100  $\mu$ l aufgefüllt wurden. Nach 20-minütigem Färbevorgang bei 4 °C mit dem Antikörper Ly6G (1:200) für die Zählung der Neutrophilen Granulozyten, wurden die Zellen vorerst bei 500 x g zentrifugiert und in 1000  $\mu$ l MACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 x g wurden die Zellen anschließend wieder in 100  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen. Für die Zellzahlbestimmung am FACS CANTO II wurde die Flussrate auf 10 $\mu$ l/min, also *low* gestellt. Die Probe wurde anschließend für 30 Sekunden gemessen. Dabei wurden, nach Geräteangaben des FACS CANTO II, 5  $\mu$ l der Probe eingezogen. Durch Identifikation der Neutrophilen Granulozyten mittels eines *Gates* im FACS-Diva-Programm, in dem aufgrund der Fluoreszenz des eingesetzten Antikörpers alle Ly6G-positiven Zellen (Ly6G<sup>+</sup>) eingeschlossen wurden, kann die Gesamtzahl der Neutrophilen in der untersuchten Probe bestimmt werden.

Die Berechnung der Zellzahl in 1 µl der Ausgangsprobe erfolgte dann wie folgt: gemessene Gesamtzahl (gG) × 20 (→ Hochrechnung auf 100 µl) gG x 20 x 100 (→ Hochrechnung auf die ursprünglichen 1000 µl)  $\frac{gGx20x100}{1000} = Zellzahl in 1 µl der Ausgangslösung$ 

Um anschließend zu berechnen, welche Menge einer aufgereinigten Blutprobe für das Erlangen einer bestimmten Zellzahl benötigt wurde, wurde der mathematische Dreisatz angewendet. So kann die Zahl Neutrophiler Granulozyten im Rahmen spezifischer Untersuchungen innerhalb von Versuchsansätzen reguliert werden.
## 2.2. Durchflusszytometrische Analyse muriner Immunzellen

Zur ersten Analyse muriner Immunzellen wurde gesunden Mäusen vorerst aus der Vena cava inferior Blut abgenommen. Die Zellen wurden nach Lyse und Zentrifugation anschließend in MACS-Puffer aufgenommen und Antikörper (s. Tabelle 2) wurden hinzugegeben. Um sowohl Neutrophile als auch Monozyten und Lymphozyten in der Durchflusszytometrie darstellen zu können, wurden drei Antikörper eingesetzt. Während CD45 (1:400) auf allen Leukozyten exprimiert ist, wird CD11b (1:200) hauptsächlich auf Granulozyten und Monozyten exprimiert. Das erlaubt eine Differenzierung von CD11b-negativen Lymphozyten (CD11b<sup>-</sup>). Um die Neutrophilen Granulozyten von den anderen Immunzellen abzugrenzen, kam ein Antikörper gegen Ly6G (1:200) zum Einsatz. Tabelle 6 zeigt noch einmal, welche Antikörper an welche Zellen binden und wie diese in der Durchflusszytometrie differenziert werden können. Die Zellen inkubierten für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln mit den Antikörpern. Anschließend wurden die Zellen herunterzentrifugiert und einmal in MACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im letzten Schritt wurden die Zellen in DAPI (1:1000 in MACS-Puffer) für eine Lebend-Tot-Färbung in FACS-Tubes aufgenommen und an einem FACS CANTO II gemessen. DAPI färbt die in den Zellkernen vorhandene DNA. Lebende Zellen haben eine funktionsfähige Zellmembran, die DAPI nicht überwinden kann. Dafür färbt es jedoch die DNA toter Zellen, die keine mechanische Barriere mehr im Sinne einer Zellmembran aufweisen.

Zellen	Vorhandene Antigene
Lymphozyten	CD45 <sup>+</sup> (1:400), CD11b <sup>-</sup> (1:200), Ly6G <sup>-</sup> (1:200)
Monozyten	CD45 <sup>+</sup> (1:400), CD11b <sup>+</sup> (1:200), Ly6G <sup>-</sup> (1:200)
Granulozyten	CD45 <sup>+</sup> (1:400), CD11b <sup>+</sup> (1:200), Ly6G <sup>+</sup> (1:200)

Tabelle 6: Immunzellen und ihre Oberflächenantigene

## 2.2.1 Oberflächenmarkierung von CD177 auf murinen Neutrophile Granulozyten

Um die Bindung des Antikörpers gegen das Oberflächenantigen mCD177 auf Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde einer Maus über die Vena cava inferior Blut abgenommen. Nach protokollgetreuer Lyse und Aufreinigung des Blutes wurde dieses in MACS-Puffer aufgenommen und mit Antikörpern versetzt. Um sowohl die Bindung an Neutrophile nachzuweisen als auch die fehlende Bindungsfähigkeit an die anderen Immunzellen darzustellen, bediente man sich erneut den Antikörpern CD45-PE-Cy7, CD11b-PE und Ly6G-PE-Cy5.5. Die eingesetzten Konzentrationen (siehe oben) blieben unverändert. Dieses Mal wurde jedoch zusätzlich ein Antikörper gegen das murine Oberflächenantigen CD177 (CD177-APC) im Verhältnis 1:100 verwendet. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte auch hier bei 4 °C für 20 Minuten. Anschließend wurde die Probe herunterzentrifugiert und einmal in MACS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen über DAPI (1:1000 in MACS-Puffer) in FACS-Tubes überführt und die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem FACS CANTO II.

## **2.3. Bindung von mNGP an murine Neutrophile Granulozyten**

#### 2.3.1. Einfluss der Peptidkonzentration auf die Bindungseigenschaften

Um die Bindungseigenschaften des murinen neutrophilenspezifischen Peptides (mNGP, neutrophilic granule protein) gegen das Oberflächenmolekül CD177 an murine Immunzellen zu untersuchen, wurde einer Maus durch die Punktion der Vena cava inferior Blut entnommen. Dieses wurde, wie oben beschrieben, aufbereitet. Hiernach erfolgte die Inkubation mit einer Antikörpermischung (CD45-PE-Cy7, CD11b-PE, Ly6G-PE-Cy5.5), sodass im FACS CANTO II die Immunzellpopulationen voneinander getrennt werden konnten. Da das CD177-Peptid ein terminales Carboxyfluorescein besitzt, kann die Bindung über den FITC-Kanal detektiert werden. Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei 4 °C und Zentrifugations- sowie Waschvorgang wurde das Blut in MACS-Puffer aufgenommen und je 200 µl wurden in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Nach Zentrifugation wurden im folgenden Schritt den Blutzellen in den Wells je 100 µl unterschiedlicher Peptidkonzentrationen (1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 10µg/ml) des CD177-Peptides hinzugefügt. Hiernach erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Daraufhin wurden die Zellen bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert und ein Waschvorgang mit MACS-Puffer wurde durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Zellen anschließend mit DAPI in einer Konzentration von 1 µg/ml (1:1000 in MACS-Puffer) aufgenommen werden und waren damit bereit für die durchflusszytometrische Untersuchung.

#### 2.3.2. Kopplung von mNGP an einen 8-Arm-PEG-Anker

Um herauszufinden, ob die Bindungseigenschaften des CD177-Peptides sich verändern, wenn mehrere Peptide in größerer sterischer Nähe auf einen entsprechenden Rezeptor einwirken, wurde das Peptid mNGP sowie ein Kontrollpeptid mCon an einen 8-armigen Polyethylenglykol (PEG)-Anker gekoppelt. Dieser bindet die Peptide über acht Maleimidgruppen an seiner Oberfläche. Für diesen Versuch erfolgte zunächst die Kopplung des Peptids an den PEG-Anker. Hierfür wurde 1 mg des 8-Arm-PEG-Ankers abgewogen in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Hiervon wurden 78  $\mu$ l mit 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ml) des Peptides (mNGP) und 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ml) eines Kontrollpeptides (mCon) in jeweils ein Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht unter Lichtausschluss bei 37 °C in einem MACS Rotator inkubiert. Anschließend wurde einer Maus Knochenmark entnommen und die darin enthaltenen Zellen wurden gezählt. Ein 100.000 Zellen enthaltenes Volumen der Suspension wurde entnommen und in eine 96-Wellplatte pipettiert. Die Wells wurden jeweils auf 100 µl mit DMEM aufgefüllt. Den Zellsuspensionen wurden anschließend je 1 µl des am vorigen Tag gekoppelten 8-Arm-PEG-mNGP-Ansatzes und des Kontrollansatzes hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem Wärmeschrank mit Schaukelplattform für 30 Minuten im Dunkeln. Nach Zentrifugation und Waschen mit MACS-Puffer erfolgte die Aufnahme in DAPI (1:1000 in MACS-Puffer). Dem folgte die durchflusszytometrische Analyse.

## 3. Herstellung und Charakterisierung von Nanoemulsionen

## **3.1. Herstellung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen**

Für die Herstellung von Nanoemulsionen können verschiedene Verfahren zum Einsatz kommen. Beispielhaft sind hier genannt: Ultraschallverfahren, Emulgierzentrifugen oder die Hochdruckhomogenisation. Letztere wurde innerhalb dieser Arbeit als mechanische Anfertigungsmethode angewendet. Dieses Verfahren dient der Herstellung feiner Nanoemulsionen aus groben Emulsionen. Mit dieser Technik ist die Produktion großer Mengen möglich und der Anteil an Liposomen, also an leeren PFCs, ist kleiner als bei anderen Verfahren<sup>56</sup>.

Die erforderlichen Prä-Emulsionen wurden aus mehreren Komponenten gebildet. Diese können ebenso wie ihre Konzentrationen der untenstehenden Tabelle 7 entnommen werden. Gezeigt sind die Komponenten einer Nanoemulsion einer Größe von etwa 100 nm. Das Abwiegen sowie das Hinzufügen der Komponenten erfolgten mit Hilfe einer Waage. 3 % (w/w) Phospholipide (Lipoid S75), 0,44 % (w/w) DSPE-mPEG<sub>2000</sub>, 0,01 % (w/w) DSPE-mPEG<sub>2000</sub>-Maleimid und 0,0045 % (w/w) Rhodamin wurden in 10 mM Phosphat-Glycerol-Puffer aufgelöst und für 30 Minuten auf einem magnetischen Schüttler präemulgiert. Im nächsten Schritt wurde der Emulsion 20 % (w/w) Perfluorkronenether hinzugefügt und die Mischung wurde mit Hilfe eines Ultra Turrax vorhomogenisiert.

Beim S75-Lipid handelt es sich um Phospholipide, die aus Sojabohnen gewonnen werden. Über das Maleimidgruppen auf der Oberfläche der PFCs können im weiteren Schritt spezifische Peptide an die PFCs gebunden werden. Rhodamin-markierte Lipide ermöglichen die Analyse der zellulären Aufnahme mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie. Die PEGylierung mit Hilfe des biokompatiblen Polymers Polyethylenglykol (PEG) ist von großer Bedeutung, da hierdurch die initiale Opsonisierung der PFCs und damit ihre unspezifische Phagozytose durch Immunzellen unterbunden wird. Polyethylenglykol fungiert als "Schutzmantel" und unterbindet die Phagozytose, körpereigene Proteaseaktivität und schützt vor der Bindung an Antikörper und Serumproteine. Andererseits würden die PFCs sehr rasch mit Serumproteinen aus dem Blut markiert und anschließend abgebaut werden, ohne ihr Ziel, die Neutrophilen Granulozyten, zu erreichen. Das Ergebnis der PEGylierung wird auch als Stealth- oder Tarnkappen-Effekt beschrieben<sup>40,57</sup>.

Komponente	Konzentration	
Lipid S75	94,975 mol %	
DSPE-mPEG <sub>2000</sub>	4,5 mol %	
DSPE-mPEG <sub>2000</sub> -Maleimid	0,5 mol %	
Rhodamin	0,025 mol %	
Perfluorkronenether (PFCE)	20 %	
Phosphat-Glycerol-Puffer	Auf 10 g auffüllen	

Tabelle 7: Komponenten zur Herstellung einer Perfluorkarbon-Nanoemulsion

#### 3.1.1. Herstellung von PFCs verschiedener Größen

Um PFCs unterschiedlicher Größe herzustellen wurden drei unterschiedliche Mengen an S75 verwendet, um so die Größe der fertigen Emulsion zu variieren. Je weniger Lipide hinzugefügt werden und je höher der relative Gehalt an PFCs, desto größer werden die Nanopartikel in den Emulsionen, da weniger Phospholipide verfügbar sind, um die innere Perfluorkarbon-Phase zu stabilisieren und umgekehrt<sup>56</sup>. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der verschiedenen PFCs (<sup>A</sup> PFC, <sup>B</sup> PFC und <sup>C</sup> PFC). Und Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der Größenunterschiede der PFCs.

Tabelle 8: PFCs verschiedener Größen und die Konzentrationen ihrer Komponenten

Komponente	<sup>A</sup> PFC	<sup>B</sup> PFC	<sup>C</sup> PFC
Lipid S75	300.321 mg	30.03 mg	17.2 mg
DSPE-mPEG <sub>2000</sub>	43.94 mg	4.4 mg	2.5 mg
DSPE-mPEG <sub>2000</sub> -Maleimid	5.15 mg	0.52 mg	0.3 mg
Rhodamin (0.1 mol %)	0.4 mg	0.4 mg	0.4 mg
Perfluorkronenether (PFCE)	2 g	2 g	2 g
Phosphat-Glycerol-Puffer	Auf 10 g	Auf 10 g	Auf 10 g
	auffüllen	auffüllen	auffüllen



**Abb. 3: Graphische Darstellung der größenvariablen PFCs.** Schematisch dargestellt sind peptidgekoppelte PFCs mit unterschiedlichem Lipidgehalt in der Emulsion: 35mM, 3,5 mM und 2 mM Lipid. Je höher der Lipidgehalt, desto kleiner die PFCs und umgekehrt.

#### 3.1.2. Hochdruckhomogenisation

Bei Hochdruckhomogenisatoren handelt es sich um Strömungsdispergiermaschinen, die nach dem Dekompressionsprinzip arbeiten. Sie bestehen aus einer Hochdruckkolbenpumpe und einem Homogenisierventil. Die Hochdruckkolbenpumpe verdichtet die eingesetzte Prä-Emulsion bei bis zu 1500 bar. Dabei kommt es nach dem Gasgesetz zu einem Temperaturanstieg, welcher durch die Umwandlung von mechanischer in thermische Energie durch die entstehenden Scherkräfte weiter verstärkt wird. Durch das einstellbare Öffnungsventil kann der Druck ruckartig entlassen werden, es kommt zur Dekompression. Die Emulsion fließt währenddessen durch das Ventil, wobei sie eine Geschwindigkeit von bis zu 300 m/s erreicht. Dabei kommt es durch die abrupte Druckreduktion zum Zerreißen der Emulsionspartikel, was zur Formation feiner Nanoemulsionen führt<sup>58,59</sup>. Die Emulsionen wurden in der vorliegenden Arbeit in 5 Zyklen bei 1000 bar in einem LV1 Microfluidizer homogenisiert. Mit jedem Zyklus werden die PFCs homogener, jedoch verringert sich hierbei auch die Partikelgröße.

#### 3.1.3. Herstellung spezifischer PFCs durch Kopplung von Peptiden

Für ein aktives Targeting haben Peptide den entscheidenden Vorteil, dass sie eine sehr geringe molekulare Masse aufweisen und zudem sehr einfach zu modifizieren sind. So lässt sich z. B. ein Cystein einfügen, um so die Kopplung der Peptide an PFCs zu ermöglichen. Die Kopplung der Peptide an die PFCs erfolgt über die Oberflächen der Emulsionen, welche ihrerseits mittels Maleimidgruppen modifiziert wurden. Diese Maleimidgruppen liegen stets in einer Menge von 0.5 mol % vor. Diese ermöglichen die Detektierbarkeit der PFCs mittels Durchflusszytometrie über das Fluorochrom PE.

Um das ideale Verhältnis des Peptids innerhalb der Emulsion zu bestimmen, wurden drei Emulsionsansätze hergestellt, in denen die Peptidkonzentrationen im Verhältnis zum Maleimid auf der Oberfläche der Perfluorkarbon-Partikel variiert wurden. Während ein Ansatz in einem Verhältnis von 1:1 von Peptidkonzentration zum vorhandenen Maleimid hergestellt wurde (300 µg Peptid auf 1 ml Emulsion), wurden zwei weitere Ansätze mit dem Peptid im Unterschuss vorbereitet. Zum einen wurde eine Emulsion mit dem Peptid im 5-fachen Unterschuss (60 µg Peptid auf 1 ml Emulsion), zum anderen im 10-fachen Unterschuss (30 µg Peptid auf 1 ml Emulsion) hergestellt. Diese Mischungen inkubierten über Nacht bei Raumtemperatur in einem

MACS-Rotator, sodass die Peptide über ihre C-terminalen Cysteinreste mit den Maleimidgruppen der Emulsion eine Bindung eingehen konnten. Abbildung 4 zeigt die graphische Darstellung eines PFC mit gekoppeltem Peptid an der Oberfläche.



Abb. 4: Graphische Darstellung eines Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikels (PFC) mit gekoppeltem Peptid an der Oberfläche. Die Abbildung zeigt graphisch die Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel, bestehend aus einem <sup>19</sup>F-Kern und einer Phospholipidhülle. Auf dieser befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin sowie, über ein Maleimid gekoppelt, das Peptid. Hierbei kann es sich um das Neutrophilen-spezifische Peptid (mNGP) oder ein Kontrollpeptid (mCon) handeln.

Die Bindung dieser Emulsionen an Neutrophile Granulozyten wurde anschließend an murinem Blut getestet. Hierfür wurde gesunden Mäusen Blut entnommen. Dieses wurde lysiert und zentrifugiert, bis ein weißes Zellpellet übrigblieb. Anschließend konnten die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen werden. Dieser Lösung wurde ein Neutrophilen-spezifischer Antikörper, Ly6G-PE-Cy5.5 im Verhältnis von 1:100, hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurde die Probe bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überschuss wurde abgeschüttet und die Zellen wurden einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Daraufhin konnten die Zellen in frischem DMEM aufgenommen werden. Vom hergestellten Ansatz wurde jeweils 100 µl entnommen und in eine 96-Wellplatte pipettiert und je 1 µl der entsprechenden Emulsion hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten auf dem Schüttler im Dunkeln. Anschließend wurde die 96-Wellplatte in der Zentrifuge bei 500 x g zentrifugiert und die Zellen wurden erneut einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit DAPI (1:1000 in MACS-Puffer) in FACS-Tubes aufgenommen Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem LSR FORTESSA (im benachbarten pharmakologischen Institiut), welches über einen Laser verfügt, der eine Anregungswellenlänge von 560 nm (Emissionspeak: 500 - 620 nm) besitzt, mit der das Rhodamin-Signal detektiert werden kann.

## 3.2. Charakterisierung von Nanoemulsionen

#### 3.2.1. Dynamische Lichtstreuung

Alle innerhalb dieser Arbeit verwendeten PFCs wurden mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) charakterisiert. Die DLS ist eine Methode zur indirekten Bestimmung von Partikelgrößen durch das Lichstreuungsverfahren. Die in dieser Arbeit genutzten PFC-Nanoemulsionen wurden für die Messungen stets 1:100 mit Wasser verdünnt. Wenn Laserlicht auf die Partikel in der Suspension trifft, erfolgt eine Streuung, die gemessen werden kann. Hieraus kann die Partikelgeschwindigkeit ermittelt werden, die sich aus der Geschwindigkeit der Änderung der gemessenen Streulichtintensitäten ergibt. Die anschließenden Berechnungen erfolgen an einem Korrelator, verbunden mit einem Computer. Es werden die Diffusionskonstanten und hierauf mittels der Stokes-Einstein-Gleichung die Partikelgrößen errechnet. Je kleiner die Partikel sind, desto schneller die Bewegungen im Milieu und desto schneller die Intensitätsänderung. Bei großen Partikeln verhält es sich genau umgekehrt<sup>60,61</sup>. Mit Hilfe der DLS-Messung kann zudem der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt werden.

Dieser ist ein dimensionsloser Wert, welcher zwischen 0 und 1 liegen kann und die Breite der Größenverteilung bzw. der Molmassenverteilung angibt. Bei dem kleinsten Wert von 0 liegen monodisperse Partikel vor, d. h. alle Partikel sind gleich groß. Werte von 0,1 bis 0,2 deuten auf eine enge Größenverteilung hin. Bei Werten ab 0,3 liegt eine breite Verteilung vor und ab 0,5 eine sehr breite Verteilung. Je größer die Verteilung, desto inhomogener sind entsprechend die zu untersuchenden Partikel in ihrer Größe.

Ein weiterer Parameter, der ebenso indirekt erhoben werden kann, ist das  $\zeta$ -Potential. Dieses gibt Auskunft über die Oberflächenladung der Partikel in einer Suspension. Gibt man elektrisch geladene Partikel in eine Suspension, so lagern sich Ionen an die Partikeloberfläche an und bewirken eine elektrische Neutralität gegenüber der Umgebung. Bewegen sich die Partikel jedoch durch die Anlage eines elektrischen Feldes in der Suspension, so verlieren sie durch Scherkräfte einige der an der Oberfläche locker haftenden Ionen. Hierdurch entsteht ein

Potential, welches entweder negativ oder positiv sein kann. Gemessen wird dieses anhand der Geschwindigkeit der Bewegung in dem Medium. Hieraus kann das  $\zeta$ -Potential errechnet werden. Je größer das Potential, ungeachtet dessen, ob im negativen oder im positiven Bereich, desto größer das Stabilitätsverhalten der Partikel.

#### 3.2.2. Fluoreszenzmessungen

Durch ein Fluoreszenzspektroskop (IVIS: *In Vivo Imaging System*) Lumina II können Fluoreszenzen gemessen werden. Hierfür wurden je 10 µl der PFCs oder Peptide als Tröpfchen auf eine Glasplatte pipettiert, welche in das Gerät gelegt wurde. Die Proben wurden mit Licht einer vorher festgelegten Wellenlänge bestrahlt und emittierten anschließend selbst Licht, welches im Winkel von 90° gemessen wurde (FOV: A, Rhodamin- sowie FITC- Anregungsund Emissionsfilter, Anregungszeit: 0.01 Sekunden, Objekthöhe: 0 mm). Anschließend wurden die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen mittels ROIs (*Regions Of Interest*) ausgewertet und die *Total Counts* und die *Average Counts* als Maß für die Fluoreszenzintensität wurden notiert.

## 3.2.3. Bestimmung des <sup>19</sup>F-Gehalts der PFCs via kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT-Bildgebung

Um den Gehalt an <sup>19</sup>F innerhalb der PFCs zu ermitteln, wurden immer drei Mal je 10 µl der PFCs in PCR-Tubes überführt und anschließend am MRT gemessen. Alle MRT-Bilder wurden an einem vertikalen 9.4 Tesla Bruker AVANCE<sup>III</sup> Spektrometer aufgenommen. Im ersten Schritt wurden <sup>1</sup>H-Bilder zur Orientierung im Frequenzbereich von 400.21 MHz aufgenommen und anschließend wurden bei 376.54 MHz <sup>19</sup>F-Messungen durchgeführt. Diese beiden Messungen können bei der anschließenden Auswertung überlagert werden, um die <sup>19</sup>F-Signale korrekt zuordnen zu können. Alle Daten am MRT wurden durch ParaVision 5.1 Software prozessiert und ausgewertet.

# 4. Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten

# 4.1. <sup>mNGP</sup>PFC-Bindung an Neutrophile Granulozyten gesunder Mäuse

<sup>mNGP</sup>PFCs wurden mit murinen Immunzellen inkubiert und es wurde untersucht, ob diese tatsächlich nur von den Neutrophilen aufgenommen werden. Als Vergleich wurden PFCs, gekoppelt mit einem Kontrollpeptid (<sup>mCon</sup>PFCs) verwendet. Untersucht wurde die Aufnahme

der PFCs durch die Immunzellen in Form einer Zeitkinetik von 0 – 80 Minuten. Hierfür wurde gesunden Mäusen Blut entnommen, welches nach anschließender Aufbereitung in DMEM aufgenommen wurde. Nach Färbung mit Antikörpern (CD45-PE-Cy7, CD11b-PE, Ly6G-PE-Cy5.5) zur Differenzierung der Immunzellen, wurden je 10 µl der <sup>mNGP</sup>PFCs/<sup>mCon</sup>PFCs auf 1000 µl Zellsuspensionen in DMEM gegeben. Die Ansätze inkubierten über einen Zeitraum von 80 Minuten auf dem Schüttler bei 37 °C im Dunkeln. Zu Beginn bei Minute 0 sowie nach 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten wurden den Ansätzen je 100 µl entnommen und in vorbeschrifteten FACS-Tubes mit 1000 µl MACS-Puffer auf Eis gestellt. Nachdem alle Proben gesammelt worden waren, wurden die Ansätze in den FACS-Tubes zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde dekantiert und verbliebene Tröpfchen wurden mit einem Papiertuch am Tube-Hals aufgesaugt. Den FACS-Röhrchen wurde anschließend jeweils 100 µl DAPI (1:1000 in MACS-Puffer) hinzugegeben. Hiernach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Bindung der Emulsionen an die Neutrophilen Granulozyten an einem LSR FORTESSA-Gerät.

## 4.2. <sup>mNGP</sup>PFC-Bindung an Matrigel/LPS-stimulierte Neutrophile

#### Granulozyten

Anschließend wurde die Bindung der  ${}^{mNGP}PFCs$  an Neutrophile Granulozyten nach Matrigel/LPS-Stimulation von Mäusen analysiert. Dies erfolgte ebenfalls in einer Zeitkinetik von 0 – 80 Minuten. Den Mäuse wurde hierfür 24 Stunden vor der Blutentnahme subkutan Matrigel/LPS implantiert. Der Versuchsablauf wurde anschließend, wie in Kapitel 4.1 beschrieben wiederholt.

## 5. Einfluss der Partikelgröße auf das aktive Targeting von Neutrophilen

Um die Frage zu klären, welchen Einfluss die Partikelgröße auf das Targeting der Neutrophilen Granulozyten hat, wurden PFCs unterschiedlicher Größe hergestellt und zunächst mittels DLS, Fluoreszenzmessung und kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT charakterisiert. Nach den Ergebnissen der Größenmessungen werden diese Nanopartikel im Folgenden <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs genannt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung des Einflusses der Partikelgröße auf das aktive Targeting von Neutrophilen Granulozyten *in vitro*. Im ersten Schritt wurden die <sup>mNGP</sup>PFCs und entsprechende <sup>mCon</sup>PFCs auf murine Zellen gegeben, welche bereits mit Antikörpern (CD45-PE-Cy7, CD11b-PE, Ly6G-PE-Cy5.5) zur Differenzierung der

Immunzellen gefärbt worden waren. Nach halbstündiger Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler im Dunkeln wurden die Proben zentrifugiert, gewaschen und in DAPI (1:1000 in MACS-Puffer) aufgenommen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem LSR FORTESSA. Nachdem die Spezifität der Emulsionen nachgewiesen worden war, galt das Augenmerk fortan nur noch den Neutrophilen Granulozyten. Es wurden weitere *ex vivo* Versuche durchgeführt. Die Emulsionen wurden auf Blut- und Knochenmarkszellen gesunder Mäuse gegeben und anschließend am LSR FORTESSA durchflusszytometrisch untersucht.

## 5.1. Einfluss von LPS auf die CD177-Expression

Zur Erforschung des Einflusses von LPS als einem Entzündungsauslöser auf die Expression von CD177 auf der Oberfläche muriner Neutrophiler Granulozyten wurden mit Hilfe eines Matrigel-LPS-Models bakterielle Lipopolysaccharide in die Nackenregion von Mäusen implantiert und anschließend wurde die Zahl CD177-positiver Neutrophile in Blut, Knochenmark und im Matrigel selbst bestimmt. In dieser Versuchsreihe wurde den Mäusen 24 Stunden nach der Implantation von Matrigel-LPS Blut und Knochenmark entnommen. Ebenso wurden die Matrigele herauspräpariert und die Zellen aus diesen gewonnen (s. Kapitel 1.3). Die Zellen von Blut, Knochenmark und Matrigel wurden anschließend lediglich mit dem Antikörper Ly6G-PE-Cy5.5 gefärbt. Nach Zentrifugation und Waschvorgang wurden die Zellansätze mit <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Aufnahme durch ein LSR FORTESSA.

## 5.2. <sup>19</sup>F-Gehalt der Zellen nach Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs

Um den <sup>19</sup>F-Gehalt der Zellen nach Bindung der PFCs darstellen zu können, wurden unbehandelte und LPS-stimulierte Mäuse verwendet. Aus diesen wurde Knochenmark gewonnen. Anschließend wurden die gewonnen Knochenmarkszellen gezählt und pro Ansatz wurden 4 x 10<sup>6</sup> Neutrophile Granulozyten bereitgestellt, die anschließend mit je 50 µl <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs für 3 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen fünfmal mit MACS-Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen PFCs auszuwaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit PFA bzw. Histo-Fix. Die anschließende Messung des Fluorgehaltes der isolierten Zellen erfolgte am MRT.

# 6. Untersuchung der CD177-Expression nach Injektion von <sup>mNGP</sup>PFCs bei Stimulation mit Matrigel/LPS

Im Folgenden *in vivo* Versuch wurde Mäusen 24 Stunden nach der Implantation von LPShaltigen Matrigelen vier Mal im Abstand von jeweils einer Stunde je 3 mM/kg KG <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs intravenös über die Schwanzvene injiziert. Einen Tag später wurde auch diesen Mäusen Blut, Knochenmark sowie Matrigel entnommen und wie oben beschrieben aufbereitet. Die Aufnahme von <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs wurde mittels Durchflusszytometrie am LSR FORTESSA analysiert.

## 6.1. In situ <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung von Mäusen nach i. v. Injektion von <sup>350nm</sup>PFCs

Nachdem der Einfluss von LPS auf die Expression von CD177 im murinen *in vivo* Modell mittels Durchflusszytometrie gezeigt worden war, wurden weitere *in vivo* Versuche mit den <sup>350nm</sup>PFCs durchgeführt, indem Mäusen an Tag 1 Matrigele mit LPS implantiert wurden, um eine lokale Entzündung im Körper der Tiere auszulösen. An Tag 2 wurden viermal, auch wieder je 3 mM/kg KG der Emulsion im Abstand von 1 Stunde über die Schwanzvene der Mäuse injiziert. An Tag 3 erfolgten die MRT-Messungen der Mäuse. Siehe hierfür auch Abbildung 5. Die Mäuse wurden vor dem Einbringen in die MRT-Resonatorspule schmerzfrei getötet, sodass weitere Fluorsignale durch das fluorhaltige Narkosemittel Isofluran ausgeschlossen werden konnten, die sonst unspezifisch im Fettgewebe sowie im Lymphsystem zu erkennen gewesen wären.



Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur *in vivo* Bildgebung. Durch die subkutane Implantation eines Matrigels mit LPS in die Nackenregion der Mäuse, wurde an dieser Stelle eine Entzündungsreaktion initiiert. Nach 24 Stunden wurden vier Mal im Abstand von einer Stunde je 3 mM/kg KG <sup>350nm</sup>PFC-Injektionen über die Schwanzvenen injiziert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach Tötung der Tiere die Visualisierung des Entzündungsherdes durch Ansteuerung der <sup>350nm</sup>PFCs mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT-Bildgebung (weißer Pfeil = Matrigel).

## Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, mittels eigens hergestellten spezifischen Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs), murine Neutrophile Granulozyten durch kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Magnetresonanztomographie (<sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT) zu visualisieren.

Im ersten Teil wurde die Expression eines murinen neutrophilenspezifischen Antigens (CD177) untersucht und die Aufnahme des entsprechenden Antikörpers/Peptides gegen CD177 in Neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch untersucht. Anschließend wurden mit Hilfe des Peptides (mNGP) gegen CD177 spezifische PFCs (<sup>mNGP</sup>PFCs) hergestellt und der Einfluss der Peptidkonzentration auf die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten wurde untersucht. Zudem wurde der Einfluss inflammatorischer Stimuli auf das aktive Targeting analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden <sup>mNGP</sup>PFCs in drei verschiedenen Größen hergestellt. Der Fokus lag darin zu untersuchen welchen Einfluss die Partikelgröße der <sup>mNGP</sup>PFCs auf das aktive Targeting der murinen Neutrophilen Granulozyten im nativen sowie inflammatorisch vorstimulierten Zustand hat. Zum Schluss wurde eine *in situ* kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MR-Bildgebung von Mäusen durchgeführt, bei denen subkutan Matrigel/LPS implantiert wurde, um einen lokalen Entzündungsherd zu erzeugen.

## 1. Aktives Targeting von murinen Neutrophilen Granulozyten

## 1.1. CD177-Expression im Blut und im Knochenmark

Im ersten Schritt musste ein Target für das spezifische Ansteuern Neutrophiler Granulozyten gefunden werden. Im Jahre 2018 wurden von Miettinen *et al.* Peptide charakterisiert und publiziert, welche gegen CD177 auf humanen und murinen Neutrophilen Granulozyten gerichtet sind<sup>62</sup>. Um die Expression von CD177 auf Neutrophilen Granulozyten nachzuweisen, wurde aus gesunden Mäusen Blut gewonnen und aus diesem die Immunzellen isoliert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Antikörpern (CD45, CD11b, Ly6G), um innerhalb der Immunzellen Neutrophile Granulozyten von Monozyten und Lymphozyten unterscheiden zu können. Zudem wurde ein CD177-spezifischer Antikörper (CD177) hinzugefügt, um das Vorkommen des CD177-Epitopes auf den unterschiedlichen Immunzellfraktionen zu überprüfen. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe der

Durchflusszytometrie untersucht. Abbildung 6 zeigt die Expression von CD177 auf den verschiedenen Immunzellsubtypen. Deutlich zu erkennen ist, dass der eingesetzte Antikörper eine signifikante Bindungsfähigkeit für Neutrophile Granulozyten aufweist. So beträgt die Anzahl CD177-positiver Neutrophilen Granulozyten 99,7  $\pm$  0,4 %, wohingegen die Bindung an Monozyten mit 3,4  $\pm$  0,6 % und Lymphozyten mit 2,3  $\pm$  3,2 % sehr gering ist. In Abbildung 6 sind zudem im unteren Teil exemplarische Histogramme dargestellt, die einmal aus Messungen ohne Einsatz eines CD177-Antikörpers und anschließend mit einem CD177-Antikörper erstellt wurden. Erwartungsgemäß ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Immunzellen ohne Inkubation mit dem CD177-Antikörper gering. Die MFI in Lymphozyten liegt bei 4,5  $\pm$  0,5, in Monozyten bei 28,2  $\pm$  7,5 und in Neutrophilen Granulozyten eine MFI von 8754,3  $\pm$  1205,1 gemessen, während im Vergleich hierzu die MFI in Lymphozyten bei 321,7  $\pm$  436,7 und in Monozyten bei 640,7  $\pm$  31,9 liegt und somit signifikant geringer ausfällt. Dies zeigt, dass der Antikörper gegen CD177 wesentlich stärker an Neutrophile Granulozyten als an Monozyten und Lymphozyten bindet.



Abb. 6: Bindung eines Antikörpers gegen CD177 an murine Immunzellen. ein oben links exemplarisches Histogramm des MFI von APC bei Bindung mit dem Antikörper gegen CD177 abgebildet und oben rechts ist eine Kontrolle ohne Einsatz des Antikörpers CD177 zu sehen. Unten ist zudem der prozentuale Anteil der Bindung vom Antikörper gegen CD177 an APC-Neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie Lymphozyten nach durchflusszytometrischer Analyse **Z**11 erkennen. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \*\*\* = p < 0.001.

Nachdem sich zeigte, dass CD177 vor allem von Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, sollte die Oberflächenexpression von CD177 auf Neutrophilen Granulozyten im Blut sowie im Knochenmark vor und nach LPS-Stimulation überprüft werden. Die Frage war, inwiefern die Expression von CD177 auf Neutrophilen Granulozyten bei Inflammation verändert ist. Für die Versuche unter stimulierten Bedingungen wurde einigen Mäusen einen Tag vor Probenentnahme Matrigel in die Nackenregion implantiert.

Dem Matrigel wurde bakterielles LPS zugesetzt, um eine Inflammation zu provozieren. Nach 24 Stunden wurden unbehandelten und inflammatorisch vorstimulierten Tieren Blut, Knochenmark, sowie bei den stimulierten Tieren zusätzlich die Matrigele entnommen und anschließend die Immunzellen isoliert. Daraufhin wurden die Neutrophilen Granulozyten durch den Antikörper Ly6G identifiziert und die CD177-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 7 verdeutlicht das Resultat der Versuchsreihe. Während bei gesunden Mäusen das CD177-Signal im Knochenmark mit 2713  $\pm$  257 leicht höher liegt als im Blutkreislauf mit 1969  $\pm$  397, ändert sich die Situation erheblich bei Implantation von Matrigel/LPS. Die MFI von CD177 steigt nach Stimulation sowohl im Blut als auch im Knochenmark und im Matrigel signifikant im Durchschnitt auf das Vierfache. So beträgt sie im Blut 10314  $\pm$  2203, im Knochenmark 9083  $\pm$  568 sowie im Matrigel 9585  $\pm$  2793. Als Kontrollwert für das Matrigel wurde hierbei das unstimulierte, native Blut verwendet, da im nativen Matrigel bzw. in einem Matrigel ohne LPS, welches als Kontrolle dienen könnte, keine Immunzellen vorhanden sind.



Abb. 7: CD177-Expression Neutrophilen auf Granulozyten aus dem Blut, dem Knochenmark und dem Matrigel gesunder Mäuse und Mäusen mit einem Matrigel/LPS-Gel. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von CD177 auf Neutrophilen Granulozyten in Blut und in Knochenmark gesunder Kontroll-Mäuse sowie vorab mit einem LPS-Matrigel-Modell vorstimulierter Mäuse. Zusätzlich zu Blut und Knochenmark ist bei den stimulierten Mäusen das Matrigel dargestellt. Dieses gesunden fehlt bei den Mäusen, wie in der Abbildung zu gekennzeichnet. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001.

## **1.2.** Aufnahme von <sup>mNGP</sup>PFCs durch Immunzellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob über ein CD177-bindendes Peptid (mNGP), PFCs spezifisch an murine Neutrophile Granulozyten binden können. Dazu wurde mNGP sowie ein Kontrollpeptid (mCon) an PFCs gekoppelt (<sup>mNGP</sup>PFCs/<sup>mCon</sup>PFCs). Anschließend wurde die

Aufnahme dieser Nanoemulsionen durch murine Immunzellen durchflusszytometrisch untersucht.

Zur Untersuchung der Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs/<sup>mCon</sup>PFCs an murine Immunzellen wurden diese *ex vivo* mit murinem Blut inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten) wurden Proben entnommen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 8, dass im Laufe der Kinetik keine nennenswerte Bindung an Lymphozyten erfolgte. Monozyten zeigten eine geringe Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs und <sup>mCon</sup>PFCs. Lediglich bei Neutrophilen Granulozyten waren höhere MFI-Werte für <sup>mNGP</sup>PFCs zu erkennen (0 Minuten: 133 ± 40; 20 Minuten: 4654 ± 1378, p < 0,05; 40 Minuten: 4385 ± 981, p < 0,05; 80 Minuten: 4181 ± 1207, p < 0,05). Im Zeitverlauf zeigt sich jedoch ein Abfall der Bindungen nach 20 Minuten. Im Gegensatz hierzu ist bei den <sup>mCon</sup>PFCs keine Bindung an Neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Die Bindung der <sup>mCon</sup>PFCs ist in den Neutrophilen vergleichbar mit der Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs bzw. <sup>mCon</sup>PFCs an Lymphozyten.



Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs und <sup>mCon</sup>PFCs an murine Immunzellen. Abgebildet sind oben Histogramme, welche die MFI der <sup>mNGP</sup>PFCs (rot) sowie der <sup>mCon</sup>PFCs (grau) bei Bindung an Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile Granulozyten zeigen. Die Histogramme zeigen exemplarische Messwerte, welche jeweils bei Minute 20 entstanden sind. **Unten** dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs sowie die der <sup>mCon</sup>PFCs an murine Immunzellen. Nach 0, 5, 10, 20, 40, 60 und 80 Minuten wurden dem inkubierenden Versuchsansatz aus murinem Blut und PFCs Proben entnommen, welche durchflusszytometrisch untersucht wurden. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 5. \* = p < 0,05.

## **1.3.** Einfluss der Peptidkonzentration auf die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs

In einem nächsten Versuch wurde untersucht, inwiefern die bei der Herstellung der Emulsionen eingesetzte Peptidmenge einen Einfluss auf die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten hat. Hierzu wurde mNGP im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10 zu den vorhandenen Maleimid-Gruppen an PFCs gekoppelt und die Bindung an Neutrophile Granulozyten untersucht. Abbildung 9 zeigt, dass die Bindung zwischen <sup>mNGP</sup>PFCs und Neutrophilen bei einem geringeren Verhältnis von mNGP zum vorhandenen Maleimid bis 1:5 zunimmt. Bei diesem Verhältnis von 1:5 konnte die höchste Fluoreszenzintensität der <sup>mNGP</sup>PFCs im PE-Kanal bei Bindung an Neutrophile Granulozyten mit 22466  $\pm$  4604 detektiert werden. Bei einem Verhältnis von 1:10 nimmt die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an die Neutrophilen Granulozyten

wiederum etwas ab. Die Bindungsfähigkeit beim 1:5-Ansatz ist signifikant besser als beim 1:1-Ansatz, jedoch nicht signifikant besser als beim weiteren Peptid-Unterschuss von 1:10. Daher wurde bei allen weiteren Versuchen das Verhältnis von 1:5 (60 µg Peptid auf 1 ml Emulsion) von mNGP zu Maleimid eingesetzt.



Abb. 9: Einfluss der Konzentration von mNGP auf die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten nach Kopplung der Peptide an die PFCs in drei Mengen. Bei einem 1:1 Verhältnis von mNGP und Maleimid ist die Bindungsfähigkeit der Zellen an die <sup>mNGP</sup>PFCs am geringsten. Wird mNGP im Unterschuss, also im Verhältnis 1:5 oder 1:10 hinzugefügt, steigt die Bindung. Eine Bindung bei einer 5-fach geringeren Peptidmenge konnte ausgehend von einem 1:1 Verhältnis die besten Ergebnisse erzielen. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \* = p < 0,05.

# **1.4. Einfluss inflammatorischer Stimuli auf das aktive Targeting von** Neutrophilen Granulozyten mittels <sup>mNGP</sup>PFCs

Da sich oben bereits zeigte, dass Entzündungsvorgänge einen starken Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD177 auf Neutrophile Granulozyten nehmen, wurde die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophilen Granulozyten von Mäusen untersucht, die vorher durch Implantation eines Matrigel/LPS-Gels stimuliert wurden.

Den Tieren wurde ein Matrigel-LPS-Gel in die Nackenregion implantiert und 24 Stunden später wurde den stimulierten Mäusen Blut entnommen. Die Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs an die Neutrophilen Granulozyten dieser Mäuse wurde wie auch in den vorangehenden Versuchsteilen in einem zeitlichen Verlauf untersucht. In Abbildung 10 sieht man deutlich, dass bei LPS-Stimulation die MFI der <sup>mNGP</sup>PFCs an die Neutrophilen Granulozyten ansteigt. So beträgt die die MFI zu Beginn (Minute 0) 163 ± 43, nach 20 Minuten beträgt sie 10659 ± 3162 (p < 0,05), nach 40 Minuten 10473 ± 2499 (p < 0,01) und nach 80 Minuten 18700 ± 5436 (p < 0,01). Die Zunahme der MFI und somit auch die Bindungsfähigkeit der <sup>mNGP</sup>PFCs ist nach Inflammation signifikant höher als im nativen, gesunden Zustand der Versuchsmäuse. Abbildung 10 zeigt zudem auch ein Histogramm, welches die höhere MFI graphisch veranschaulicht.



Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs an murine Neutrophile Granulozyten in gesunden und Matrigel/LPS-stimulierten Mäusen. Links ist ein exemplarisches Histogramm von Minute 20 zu sehen. In grau dargestellt ist die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten in gesunden Mäusen und in rot die Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten von mit einem LPS-Matrigel stimulierter Mäuse. Die **rechte** Grafik zeigt die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an murine Neutrophile Granulozyten nach subkutaner Stimulation der Versuchstiere mit einem Matrigel-LPS-Gel. In grau aufgetragen ist die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten in gesunden Kontrollmäusen. Die roten Punkte zeigen die gesteigerte Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten aus LPS-stimulierten Mäusen. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 4. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01.

## **1.5. Bindungseigenschaften von freiem mNGP an Neutrophile Granulozyten**

Während der Versuche hat sich die Fragestellung ergeben, ob mNGP auch ohne PFCs als Carrier an Immunzellen binden kann. Um dies zu überprüfen, wurde murines Vollblut mit aufsteigenden Mengen (1  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) von mNGP sowie einem Kontrollpeptid (mCon) inkubiert. Zur Differenzierung der Immunzellen wurde zu den Ansätzen Antikörper gegen CD45, CD11b und Ly6G hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert und anhand des am Peptid befindlichen Carboxyfluoresceins kann an eine Peptidbindung an die Immunzellen nachgewiesen werden. Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 11, dass die Anzahl an positiven Neutrophilen Granulozyten sehr gering ist (links, rot).



Abb. 11: Bindung von freiem mNGP an murine Immunzellen. Die linke Abbildung zeigt die fehlende Bindungsfähigkeit von freiem mNGP an Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten bei Zugabe von 1  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml des Peptids. Die Abbildung rechts stellt ergänzend hierzu die Bindungen mit dem Kontrollpeptid (mCon) dar. Weder das CD177-Peptid noch das Kontrollpeptid zeigen relevante Bindungen mit Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten. n = 3. L = Lymphozyten, M = Monozyten, N = Neutrophile Granulozyten.

#### 1.5.1. Fluoreszenzmessung der Peptide

Da mNGP im vorherigen Versuch keinerlei Bindungen an die Immunzellen zeigte, wurden anschließend die Fluoreszenzen von mNGP und mCon ermittelt, um beurteilen zu können, ob die fehlende Bindung zwischen Peptid und Rezeptor gegebenenfalls auf eine zu schwache Fluoreszenz der Peptide zurückzuführen ist. Hierfür Peptide mittels eines IVIS Lumina Fluoreszenzspektrometers analysiert. Abbildung 12 zeigt die dabei ermittelten mittleren Fluoreszenzwerte des Carboxyfluoresceins. Die Peptide mNGP/mCon weisen mit 1,9 x  $10^7 \pm 7$ x  $10^5$  für mNGP und 1,8 x  $10^7 \pm 2$  x  $10^6$  für mCon eine ausreichende mittlere Fluoreszenzstärke sowie keine eindeutigen Unterschiede untereinander auf, so dass die fehlende Bindung in der Durchflusszytometrie ihren Ursprung nicht in zu geringen Fluoreszenzen hat.



Abb. 12: Fluoreszenzmessungen von mNGP und mCon. Zu sehen sind die mittleren Fluoreszenzen von mNGP sowie mCon, welche mit von einem Fluoreszenzspektrometer ermittelt sind wurden. Links beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen. Es lässt sich in beiden Fällen Fluoreszenzsignal detektieren. Zudem gehen keine nennenswert großen Unterschiede in der Fluoreszenz der Peptide daraus hervor. Auf der rechten Seite ist die Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen zu sehen. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3.

## 1.5.2. Nachweis der Peptidbindung anhand eines 8-Arm-PEG-Ankers

In der Publikation von Miettinen *et al.*, in welcher das Peptid identifiziert wurde, ist dieses an ein Carrierprotein in Form von Liposomen gebunden<sup>62</sup>. Daher wurde vermutet, dass durch die Kopplung des Peptids an das Carrierprotein die Konformation der Peptide verändert werden. Um dies zu überprüfen, wurde das Peptid an einen achtarmigen PEG-Maleimid-Anker gekoppelt. In diesem Zuge wurden zunächst mNGPs mit dem 8-Arm-Anker inkubiert und anschließend wurde diese Verbindung zu Blut- und Knochenmarkszellen hinzugegeben und die Bindung an murine Neutrophile wurde durchflusszytometrisch analysiert. Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 13, dass eine Bindung des mNGP an Neutrophile Granulozyten über die 8-Arm-PEG-Anker sowohl im Blut als auch im Knochenmark vorhanden ist. So beträgt die MFI der positiven Neutrophilen Granulozyten im Blut 8081,7  $\pm$  1402,8 und im Knochenmark 7230  $\pm$  2143. Dem gegenüber ist die Bindung des mCon deutlich geringer. Die MFI der positiven Neutrophilen Granulozyten beträgt hierbei im Blut lediglich 2706  $\pm$  524 und im Knochenmark: 3084  $\pm$  677.



Abb. 13: Bindung von mNGP an Neutrophile Granulozyten über einen 8-Arm-PEG-Maleimid-Anker. Gezeigt ist das durchflusszytometrische Ergebnis der Bindung von mNGP an murine Neutrophile Granulozyten aus Blut auf der linken Seite sowie aus Knochenmark auf der rechten Seite, nachdem die Peptide an einen 8-Arm-PEG-Maleimid-Anker gekoppelt wurden. Ergänzend zum spezifischen mNGP wurde zudem die Bindung an ein unspezifisches Kontrollpeptid mCon (schraffiert) überprüft. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \*\* = p < 0,01, \* = p < 0,05.

## 2. Einfluss der Partikelgröße auf das Targeting

Die Größe von Nanoemulsionspartikeln hat einen entscheidenden Einfluss auf das Aufnahmeverhalten in unterschiedliche Zelltypen. Um den Einfluss der Partikelgröße auf das Targeting der Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden drei Emulsionen mit unterschiedlichem Lipidgehalt hergestellt. Je geringer der Anteil an S75 in der Emulsion ist, desto größer werden die Partikel. Um eine Aufnahme in Monozyten/Makrophagen zu unterbinden, wurden in sämtliche Partikeloberflächen Polyethylenglykol eingebracht (PEGylierung). Zudem sind die Emulsionen zusätzlich mit Rhodamin und einem Carboxyfluorescin markiert, weshalb sie auch mit untersucht werden können.

## 2.1. Partikelanalytik der hergestellten PFCs

Zur Charakterisierung der Partikel wurden die Größe, die Größenverteilung, das Oberflächenpotential und die mittleren Fluoreszenzen bestimmt.

#### 2.1.1. DLS-Messungen

Die Charakterisierung der Partikel mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) liefert Daten über die Größe der Partikel, die Größenverteilung und das Oberflächenpotential. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen für die drei unterschiedlich großen  $^{mNGP}$ PFCs. Die kleinsten Partikel haben eine durchschnittliche Größe von 143 nm ± 2 nm und werden im folgenden  $^{150nm}$ PFCs genannt. Die mittleren Partikel haben eine Größe von etwa 354 nm ± 5 nm. Sie werden folgend als  $^{350nm}$ PFCs beschrieben. Und die größten Partikel weisen eine Größe von 476 nm ± 67 nm auf. Sie werden mit  $^{500nm}$ PFCs beschrieben. Je größer die Partikel werden, desto höher der PDI. So ist die Größenverteilung der  $^{150nm}$ PFCs noch recht gering mit 0,12 ± 0,01, bei den  $^{350nm}$ PFCs liegt sie bei 0,24 ± 0,03 und bei den  $^{500nm}$ PFCs werden PDI-Werte von 0,33 ± 0,06 erreicht. Auch das  $\zeta$ -Potential wird mit steigender Partikelgröße negativer. So beträgt dieses bei den 150 nm großen Emulsionen – 38,5 ± 0,5, bei Emulsionen der Größe 350 nm – 41,4 ± 0,7 sowie bei den 500 nm großen Partikeln – 43,8 ± 6,7.



Abb. 14: DLS-Messungen von PFCs mit unterschiedlichem Lipidgehalt. Die Abbildungen zeigen die unterschiedlichen Größen, die Größenverteilung und das  $\zeta$ -Potential der jeweiligen Partikel mit unterschiedlichem Lipidgehalt: 35 mM, 3,5 mM und 2 mM. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

#### 2.1.2. Fluoreszenzmessungen

Die Messungen der entsprechenden Fluoreszenzen der Emulsionen und der daran gekoppelten Peptide erfolgten an einem IVIS Spektrometer. Die Messungen in Abbildung 15 zeigen sehr starke Fluoreszenzen bei den <sup>350nm</sup>PFCs, sowohl das FITC- mit einem mittleren Fluoreszenzwert von 8,8 x  $10^9 \pm 2,8$  x  $10^8$  als auch das Rhodamin-Signal mit 8,1 x  $10^9 \pm 2,8$  x  $10^8$  betreffend. Die Fluoreszenzen können auch bei den kleineren  ${}^{150nm}$ PFCs gut detektiert werden. Der mittlere Fluoreszenzwert für das FITC-Signal beträgt hier 8,2 x  $10^9 \pm 4,7$  x  $10^8$  und für das Rhodamin-Signal 6,2 x  $10^9 \pm 4,9$  x  $10^8$ . Die größeren  ${}^{500nm}$ PFCs-Partikel jedoch fluoreszieren nur schwach. Im FITC-Kanal wurden nur 1,2 x  $10^9 \pm 1,8$  x  $10^8$  gemessen und für das Rhodamin 3,6 x  $10^7 \pm 8,0$  x  $10^6$ .



Abb. 15: Fluoreszenzmessungen von <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs. Dargestellt sind jeweils die FITCund die Rhodamin-Fluoreszenzen der <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs sowie der <sup>500nm</sup>PFCs mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers. Auf der linken Seite sind exemplarische Fluoreszenzaufnahmen von FITC (oben) und Rhodamin (unten) zu sehen. Die **rechte** Abbildung zeigt die quantitative Analyse. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

## 2.2. Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs an murine Immunzellen

Im nächsten Schritt wurde die Bindung der <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs an murine Immunzellen durchflusszytometrisch untersucht. Die in Abbildung 16 abgebildeten Ergebnisse zeigen deutlich die verstärkte Aufnahme der <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs von Neutrophilen Granulozyten. Im Mittel beträgt die MFI aller spezifischen <sup>mNGP</sup>PFCs-Größen in Lympho- und Monozyten bei 3346 ± 1534. Die MFI der <sup>350nm</sup>PFCs liegt in Neutrophilen Granulozyten mit 152000 ± 9539 höher als die der <sup>500nm</sup>PFCs mit 88133 ± 9016 und die der <sup>150nm</sup>PFCs mit 48100 ± 3304. Zudem zeigt sich, dass die  ${}^{350nm}$ PFCs gegenüber den  ${}^{150nm}$ PFCs signifikant besser (p < 0,01) von Neutrophilen Granulozyten gebunden werden.

Als Kontrolle wurden zudem <sup>mCon</sup>PFCs der gleichen Größen eingesetzt, um die spezifische Bindungsfähigkeit der <sup>mNGP</sup>PFCs zu untersuchen. Die MFI von PE der <sup>mCon</sup>PFCs aller Größen zeigen in Lymphozyten und Monozyten mit 4109  $\pm$  2166 vergleichbare Werte wie bei Bindung der <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs an die zwei Immunzellgruppen. Interessant ist die etwas stärkere Bindungsfähigkeit der <sup>mCon</sup>PFCs der Größe 350 nm an Neutrophile Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollen der Größen 150 nm und 500 nm. Die MFI liegt hierbei im Mittel bei 17300  $\pm$  953.



Abb. 16: Aufnahme von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs in murinen Immunzellen. Dargestellt sind in der oberen Reihe Histogramme, welche die MFI der <sup>mNGP</sup>PFCs bei Bindung an die <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs exemplarisch darstellen. In der Mitte dargestellt sind die MFI [PE] der <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen 150 nm, 350 nm und 500 nm, gebunden an Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile Granulozyten. In schraffierten Säulen in der untersten Reihe wird die MFI von <sup>mCon</sup>PFCs nach Inkubation mit Immunzellen gezeigt. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 3. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

# 2.3. Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs an LPS-stimulierte Neutrophile

## Granulozyten

Nachdem im vorigen Versuch gezeigt wurde, dass <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs unterschiedlich gut, aber spezifisch an Neutrophile Granulozyten binden, wurde der Fokus auf diese Immunzellen im Speziellen gelegt und ihre Bindung an unstimulierte und stimulierte Neutrophile Granulozyten untersucht. Diese Zellen wurden aus Blut, Knochenmark und bei stimulierten Mäusen zusätzlich aus dem Matrigel/LPS-Gel gewonnen.

Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 17 links, dass die <sup>350nm</sup>PFCs die höchste MFI aufweisen, sowohl im Blut mit 52166  $\pm$  15203 als auch im Knochenmark mit 64316  $\pm$  5228. Auch nach LPS-Stimulation der Versuchsmäuse (siehe Abb. 17 rechts) bleibt die Bindung der <sup>350nm</sup>PFCs am stärksten mit MFI-Werten im Blut von 53443  $\pm$  8448 und im Knochenmark von 53166  $\pm$ 6942. Bei Verwendung von <sup>mCon</sup>PFCs sind keine Bindungen zu erkennen. Die MFI der <sup>mNGP</sup>PFCs sind gegenüber der MFI der <sup>mCon</sup>PFCs statistisch signifikant. Zudem sind in Abbildung 17 exemplarische Histogramme zu sehen, welche graphisch gut darstellen, dass die <sup>350nm</sup>PFCs die höchste MFI aufweisen.



Abb. 17: *Ex vivo* Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs in nativen und in mit einem Matrigel/LPS-Gel stimulierten Mäusen. Dargestellt ist die Bindung der <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten, die aus Blut und Knochenmark nativer (**links**) sowie von mit Matrigel/LPS-Gel stimulieten Mäusen (**rechts**) gewonnen wurden in Punktdiagrammen sowie, jeweils exemplarisch für ein jeweils Tier in Histogrammen. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 7. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

Zusätzlich zu Blut und Knochenmark wurde bei den mit LPS stimulierten Tieren das Matrigel aus der Nackenregion herauspräpariert und die darin befindlichen Immunzellen isoliert. Anschließend wurden auch diese Zellen mit <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen 150 nm, 350 nm und 500 nm inkubiert. Abbildung 18 zeigt, dass die höchste MFI auch hier bei den 350 nm großen Partikeln mit 41666,7  $\pm$  15188,9 nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich hierzu wurde bei den <sup>150nm</sup>PFCs ein MFI von 15400  $\pm$  4272 und bei den <sup>500nm</sup>PFCs ein MFI von 23700  $\pm$  9544,1 ermittelt.



Abb. 18: Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten einem aus Matrigel/LPS-Gel. Abgebildet sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Analyse der Zellen, die aus dem mit LPS versetzten Matrigel isoliert und mit 150nmPFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs sowie mit <sup>mCon</sup>PFCs als (transparente Kontrolle Punkte) inkubiert wurden. Links ist die MFI in einem Punktdiagramm dargestellt, rechts exemplarisch für ein Tier in Form eines Histogrammes. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3. \* = p < 0.05.

## 2.4. Ex vivo <sup>19</sup>F-MRT von Neutrophilen Granulozyten

Um das <sup>19</sup>F-Signal der Zellen, nach Aufnahme der <sup>mNGP</sup>PFCs darstellen zu können, wurde nativen und LPS-Matrigel-stimulierten Mäusen Knochenmark entnommen und daraus die Immunzellen aufgereinigt. Nach Inkubation mit <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen 150 nm, 350 nm und 500 nm wurde im MRT untersucht, ob und wie stark die Aufnahme der PFCs in den Neutrophilen Granulozyten erfolgt ist. Hierfür wurde der <sup>19</sup>F-Gehalt der Proben ermittelt. Abbildung 19 zeigt <sup>19</sup>F-MRT-Messungen von Reaktionsgefäßen mit pelletierten Neutrophilen. Die MRT-Aufnahmen zeigen visuell das höhere <sup>19</sup>F-Signal der Proben, die mit <sup>350nm</sup>PFCs inkubiert wurden im Vergleich zu den mit <sup>150nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs inkubierten Proben, sowohl in gesunden als auch in LPS-stimulierten murinen Neutrophilen Granulozyten. Zu erkennen ist dies am helleren Signal der Pellets in den Reaktionsgefäßen. In Abbildung 20 ist im unteren Bildabschnitt zudem die Quantifizierung der Messwerte dargestellt.





Abb. 19: <sup>19</sup>F-Signal von Neutrophilen Granulozyten aus Knochenmark dem gesunder und LPS-stimulierter Mäuse nach ex vivo Inkubation mit <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs. Die Abbildungen zeigen das <sup>19</sup>F-Signal nach ex vivo Inkubation gesunder/nativer und in vivo vorstimulierter Neutrophilen Granuloyzten aus dem Knochenmark mit <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen 150 nm, 350 nm sowie 500 nm. Die obere Abbildung zeigt exemplarische Protonenaufnahmen in der oberen Reihe, in der Mitte die dazugehörigen <sup>19</sup>F-Aufnahmen und unten die Überlagerungsbilder. Die quantitative Analyse des 19F-Signals auf der unteren Abbildung macht deutlich, dass die <sup>350nm</sup>PFCs die beste Neutrophilenbindung aufweisen. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SD. n = 3.

## 2.5. In vivo Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten

Da nach *in vivo* Applikation eine Vielzahl an Faktoren auf die PFCs einwirken, die deren Bindungsverhalten an die murinen Immunzellen beeinflussen können, wurde im nächsten Schritt die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs *in vivo* an Neutrophile Granulozyten untersucht. Hierfür wurde LPS-stimulierten Mäusen 24 Stunden nach Implantation des Matrigels bzw. nativen Mäusen die <sup>mNGP</sup>PFCs jeweils einer Größe intravenös über die seitliche Schwanzvene injiziert. Nach einer Stunde wurde den Mäusen Blut und

Knochenmark sowie das LPS/Matrigel entnommen und die Immunzellen aus diesen isoliert. Hiernach wurde die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs durchflusszytometrisch untersucht.

Das Ergebnis der FACS-Analyse in Abbildung 20 links zeigt oben die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs im Blut gesunder Mäuse. Es zeigt sich kein nennenswerter Unterschied in der MFI zwischen den <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs auf Neutrophilen Granulozyten. Betrachtet man jedoch den Prozentsatz der Neutrophilen, die tatsächlich die einzelnen <sup>mNGP</sup>PFCs gebunden haben, wird erkennbar, dass die <sup>350nm</sup>PFCs mit 87  $\pm$  16 % eine höhere Zahl Neutrophiler Granulozyten binden als die <sup>150nm</sup>PFCs mit 67  $\pm$  27 % und die <sup>500nm</sup>PFCs mit 63  $\pm$  22 %. Zudem ist in einem Histogramm die höhere MFI der <sup>350nm</sup>PFCs visuell dargestellt.

Die MFI von <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs, welche an Neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark der murinen Versuchstiere binden, ist in gesunden Mäusen gegenüber den MFI-Werten aus dem Blut reduziert. Die Anzahl positiver Neutrophile Granulozyten beträgt beim Einsatz der <sup>150nm</sup>PFCs 32,2  $\pm$  33,7 %, bei den <sup>350nm</sup>PFCs 23,3  $\pm$  18,3 % sowie bei den <sup>500nm</sup>PFCs 17,6  $\pm$  5,4 %. Die kleineren <sup>150nm</sup>PFCs zeigen also bei gesunden Mäusen minimal bessere Bindungsfähigkeiten als die <sup>350nm</sup>PFCs und die <sup>500nm</sup>PFCs.

Bei Stimulation der Mäuse durch Matrigel/LPS ändert sich das Ergebnis der Durchflusszytometrie, wie in Abbildung 21 rechts zu erkennen ist. Die MFI vom Rhodamin der <sup>350nm</sup>PFCs ist hier im Blut mit 77267  $\pm$  5281 deutlich höher als bei den <sup>150nm</sup>PFCs mit 18700  $\pm$  2884 und bei den <sup>500nm</sup>PFCs mit 48000  $\pm$  15696. Zudem werden durch alle <sup>mNGP</sup>PFCs annähernd 100 % der Neutrophilen im Blut der Mäuse markiert.

Das Ergebnis im Knochenmark LPS-stimulierter Mäuse ist ähnlich zu der Situation in den gesunden Mäusen und zeigt lediglich einen höheren Prozentsatz an markierten Zellen. Es sind beim Einsatz der <sup>150nm</sup>PFCs 45 ± 18 % der Zellen positiv markiert. Bei den <sup>350nm</sup>PFCs sind es 59 ± 15 % der Zellen und beim Einsatz der größeren <sup>500nm</sup>PFCs sind es 42 ± 13 % der Zellen. Die MFI der <sup>500nm</sup>PFCs ist jedoch stärker als bei den beiden anderen PFCs, also den <sup>150nm</sup>PFCs und den <sup>350nm</sup>PFCs.

Besonders interessant ist zudem die Untersuchung des Bindungsverhaltens der <sup>mNGP</sup>PFCs an den Neutrophilen Granulozyten aus den LPS-Matrigelen, also dem Entzündungsherd selbst, nachdem die <sup>mNGP</sup>PFCs zuvor intravenös in den murinen Kreislauf eingebracht worden sind. Abbildung 20 rechts zeigt unten, dass sowohl die MFI der an die Neutrophilen Granulozyten

gebundenen <sup>350nm</sup>PFCs mit 1458 ± 529 als auch die Zahl der Neutrophilen Granulozyten, die die <sup>350nm</sup>PFCs gebunden haben mit 57 ± 17 % deutlich stärker ist als die der <sup>mNGP</sup>PFCs der anderen beiden Größen.



Abb. 20: *In vivo* Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten von nativen und mit einem Matrigel/LPS-Gel stimulierten Mäusen. Abgebildet sind die Ergebnisse der durchflusszytometrichen Untersuchungen, in denen die Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs der Größen 150 nm, 350 nm und 500 nm an Neutrophile Granulozyten *in vivo* untersucht wurde. Die Untersuchungen erfolgten mit Blut, Knochenmark sowie Matrigelen aus gesunden sowie mit einem Matrigel/LPS-Gel stimulierten Mäusen. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse in nativen Mäusen dargestellt und rechts sind die Werte bei vorheriger Stimulation erkennbar. Die erste Zeile zeigt jeweils die Ergebnisse bei einer Inkubation der <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs mit Zellen aus dem Blut. Die mittlere Spalte zeigt die Ergebnisse nach Inkubation mit Knochenmarkszellen und die unterste Zeile stellt die Ergebnisse nach Inkubation mit Zellen aus dem Matrigel dar. Da gesunde Mäuse im nativen Zustand kein Matrigel besitzen, ist entsprechend in der letzten Zeile auf der linken Seite nichts abgebildet. Rechts jedoch sind die Ergebnisse nach Inkubation der <sup>150nm - 500nm</sup>PFCs mit Zellen aus sehen. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 3

# 2.5.1 *In situ* kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung von LPS-stimulierten Mäusen nach Verabreichung von <sup>350nm</sup>PFCs

Abschließend sollten die spezifischen PFCs in den Organismus eingebracht werden, um Neutrophile Granulozyten zu markieren, die anschließend *in situ* mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT visualisiert werden sollten. Hierzu wurden Mäuse erneut durch ein im Nacken implantiertes, mit LPS vermischtes Matrigel inflammatorisch stimuliert. 24 Stunden später wurden über einen Zeitraum von vier Stunden im Abstand von jeweils einer Stunde <sup>350nm</sup>PFCs intravenös injiziert. Es wurden ausschließlich <sup>mNGP</sup>PFCs dieser Größe verwendet, da sich diese Partikelgröße in den vorausgehenden *ex vivo* und *in vivo* Versuchen als diejenige mit der besten Bindung an Neutrophile Granulozyten herausstellte. Neben den <sup>mNGP</sup>PFCs wurden, zur Sicherstellung der Spezifität des <sup>19</sup>F-Signals, als Kontrolle <sup>mCon</sup>PFCs eingesetzt. Am dritten Tag erfolgte dann die Darstellung des inflammatorischen Entzündungsherdes *in situ* in der Nackenregion durch kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung.

Abbildung 21 zeigt links die anatomischen MRT-Aufnahmen, die <sup>19</sup>F-Bilder sowie übereinandergelagerten <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Datenreihen. Die obere Reihe zeigt das Ergebnis beim Einsatz von <sup>mCon</sup>PFCs der Größe 350 nm. Es stellt sich in der Überlagerung mit der Protonenaufnahme kein Signal im Bereich des implantierten KPS-Matrigels dar. Lediglich im Bereich um das Rückenmark und die Wirbelsäule sowie einseitig im Bereich des Ohres des Versuchstieres zeigen sich Signale in Lymphknoten und Knochen. Deutlicher wird es bei Anwendung der <sup>350nm</sup>PFCs. Die untere MRT-Bilderreihe zeigt auch hier Signale im Bereich des Rückenmarkes. Jedoch zeigt auch das Matrigel ein starkes Signal in der <sup>19</sup>F-Aufnahme. Mit Hilfe der <sup>350nm</sup>PFCs konnte somit ein vorab generierter inflammatorischer Fokus markiert und in einer <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung detektiert werden. Auf der rechten Seite die Quantifizierung des <sup>19</sup>F-Signals im Matrigel dargestellt.



Abb. 21: Kombinierte <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Bildgebung von LPS-stimulierten Mäusen nach Injektion von <sup>350nm</sup>PFCs. Die linke Abbildung zeigt Bilder aus magnetresonanztomographischen Untersuchungen. Während die Bilder ganz links die anatomischen <sup>1</sup>H-Aufnahmen zur Orientierung in der Maus zeigen (weiße Pfeile = Matrigel), sind auf den mittleren Bildern die <sup>19</sup>F-Signale im Gewebe dargestellt. Auf den <sup>1</sup>H-Aufnahmen sind in Buchstaben zur Orientierung einige anatomische Landmarken dargestellt. R: Rückenmark, L: Luftröhre, A: Augenhöhle, K: Kleinhirn, O: Ohren, W: Wirbelsäule. Die Bilder auf der rechten Seite zeigen die Überlagerungen der <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-Aufnahmen. Die Grafik rechts zeigt die quantifizierte Analyse der <sup>19</sup>F-Signale. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 3
### Diskussion

Neutrophile Granulozyten zählen zu den ersten Zellen, die in entzündete Gewebe einwandern. Zudem kann durch die Anzahl sowie das Vorhandensein spezifischer Subpopulationen eine Aussage über die Schwere der Erkrankung sowie über die Prognose, d. h. den Verlauf der voraussichtlichen Heilungsphase getroffen werden<sup>21</sup>. Eine Möglichkeit, Neutrophile Granulozyten in einem inflammatorischen Gebiet zu markieren, bietet das aktive Targeting. Es beschreibt die spezifische Ansteuerung der entsprechenden Immunzellen durch Oberflächenfunktionalisierung der Transportmoleküle. Die angesteuerten Immunzellen, ihre Lokalisation und ihre Häufung können anschließend z.B. mittels MRT-Bildgebung visualisiert werden. Das Ziel innerhalb der vorliegenden Arbeit war die Ermöglichung und Verbesserung des aktiven Targetings und damit die Bindung der PFCs an Neutrophile Granulozyten anhand verschiedener Variationen bei der Herstellung der PFCs, sodass diese optimierten PFCs für die Entzündungsbildgebung mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F MRT eingesetzt werden konnten. Um dies zu erreichen, wurden PFCs mit einem Peptid (mNGP) funktionalisiert, das an den Oberflächenrezeptor mCD177 der Neutrophilen bindet (mNGPPFCs). Die Spezifität der <sup>mNGP</sup>PFCs wurde überprüft und die Partikelgröße, die Fluoreszenzintensität und der Fluorgehalt charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass eine höhere Konzentration des Peptids (35µM) die Bindung an Neutrophile verbessert. Darüber hinaus wurde die Auswirkung der Partikelgröße auf die Aufnahme von Neutrophilen untersucht, wobei 350 nm große Partikel die beste Aufnahme durch Neutrophile Granulozyten zeigten. Unter entzündlichen Bedingungen durch LPS/Matrigel-Implantation in Versuchstieren wurde zudem aufgrund einer erhöhten Expression von mCD177 auf der Oberfläche der Neutrophilen Granulozyten eine verstärkte Aufnahme von <sup>mNGP</sup>PFCs durch Neutrophile festgestellt. Schließlich wurde in Mäusen gezeigt, dass nach der Injektion von 350 nm großen <sup>mNGP</sup>PFCs im <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT Entzündungsherde erfolgreich dargestellt werden können. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die spezifische Ansteuerung und Beladung von Neutrophilen Granulozyten mit <sup>mNGP</sup>PFCs möglich ist, insbesondere unter entzündlichen Bedingungen. Die 350 nm großen <sup>mNGP</sup>PFCs erwiesen sich als besonders effektiv für das Targeting von Neutrophilen Granulozyten in vitro und in vivo.

#### **Aktives Targeting von Neutrophilen Granulozyten**

Durch eine Optimierung der Neutrophilen-PFCs kann die Forschung im Bereich der Kontrastmittelanwendungen zur Markierung entzündlicher Prozesse beträchtlich profitieren. Denn im Gegensatz zu den sich in Gebrauch befindlichen Kontrastmitteln sind PFCs vollkommen inert und nicht toxisch<sup>63,64</sup>. Ein langfristiger Ersatz herkömmlicher Kontrastmittel durch PFCs in der klinischen Anwendung am Menschen wäre sicherlich ein positiver Beitrag für die diagnostische, aber auch therapeutische Medizin. Das bis dato am häufigsten intravenös verwendete MRT-Kontrastmittel ist das Gadolinium, gebunden an Chelatoren in Gd-Chelatkomplexen. In dem Zusammenhang wird oft das Krankheitsbild der Nephrogenen Systemischen Fibrose (NSF) genannt, welches bei nierenkranken Patienten ausgelöst werden kann<sup>65-67</sup>. Auch die Frage nach langanhaltenden Schäden trotz intakter Bluthirnschranke bei Einsatz von Gadolinium in der MRT-Bildgebung durch Akkumulation im zentralen Nervensystem lässt den Umgang mit Gadolinium nach und nach unsicherer erscheinen und erfordert die Erforschung alternativer Kontrastmittel<sup>68-71</sup>. Bereits etablierte Ansätze, um Neutrophile Granulozyten anzusteuern, bedienen sich unter anderem mit Tyrosinkinase-Inhibitoren beladener Albumin-Nanopartikel, welche von Neutrophilen Granulozyten aufgenommern werden, die an entzündeten Endotheloberflächen anhaften. Dies blockiert die Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten und kann hierdurch ihren Verbleib in der Blutzirkulation befördern. Ziel der erwähnten Arbeit war es, die proinflammatorischen Effekte Neutrophiler Granulozyten zu unterbinden und hierdurch das Fortschreiten einer Entzündung zu verhindern bzw. deren Schwere zu reduzieren. Eine Bildgebung der Albumin-Nanopartikel erfolgte jedoch in diesem Ansatz unter Anwendung von Fluorenszenzkameras<sup>72</sup>. Weiter findet man in der Literatur einen älteren Ansatz, in welchem magnetische Partikel verwendet wurden, um Abszesse via MRT ausfindig zu machen<sup>73</sup>. Zudem wurden Neutrophile Granulozyten, genauer gesagt das HNP-1 (human neutrophil peptide-1) der Neutrophilen bereits in der Szintigraphie eingesetzt. HNP-1 wurde aus humanem Blut isoliert und an <sup>99m</sup>Tc gekoppelt. Mäusen wurden zuvor krankheitserregende Bakterien injiziert. Nach Injektion von <sup>99m</sup>Tc-HNP-1, konnte in der Szintigraphie bereits nach fünf Minuten eine Akkumulation von <sup>99m</sup>Tc-HNP-1 am der Infektionsstelle visualisiert werden. In einem weiteren Versuchsmodell wurde anschließend gezeigt, dass <sup>99m</sup>Tc-HNP-1 etwa 1000-fach stärker an die Bakterien gebunden hat als an die vorhandenen Leukozyten. Die Bindung an die Bakterien hat also zur Anreicherung am inflammatorischen Herd beigetragen<sup>74</sup>.

## <sup>19</sup>F MRT-basierte Darstellung von Neutrophilen Granulozyten mittels passivem Targeting

Die Anwendung von PFCs in der Bildgebung ist nicht neu. Im Jahre 2008 wurden PFCs erstmalig im Rahmen der <sup>19</sup>F-MRT-Bildgebung verwendet, um *in vivo* inflammatorische Prozesse im Rahmen eines experimentell induzierten Myokardinfarktes in der Maus bildlich darstellen zu können<sup>37</sup>. Aber auch in anderen Bereichen sind PFCs schon lange bekannt. Sie wurden vor etwa dreißig Jahren als künstliche Sauerstoffträger ("flüssige Beatmung") durch Bradley und Fuhrmann intrapulmonal in der Kombination mit einer Überdruckbeatmung am Menschen erprobt. Der Prozess wurde als *perfluorocarbon associated gas exchange* (PAGE) beschrieben. Heutzutage ist diese Methode unter *partial liquid ventilation* (PLV) bekannt. Erprobt wurde dies ebenso an frühgeborenen Säuglingen, die mit unterentwickelten Lungen auf die Welt kamen und an denen eine Surfactant-Therapie gescheitert war<sup>75-77</sup>. Die Literatur zeigt zudem zahlreiche weitere Ansätze, die die Anwendung von PFCs in der Bildgebung sowie in der Therapie darstellen<sup>78,79</sup>.

PFCs eignen sich besonders gut für die Kontrastmittel-Bildgebung, da der Anteil an Fluor im Organismus verschwindend gering ist und von außen zugeführte Fluorverbindungen somit hintergrundfrei dargestellt werden können<sup>80,81</sup>. Werden PFCs intravenös injiziert, können diese entweder frei über den Blutstrom oder aber nach Aufnahme durch Immunzellen an den Ort der Entzündung bzw. an die Organe/Gewebe des Interesses wandern und dort via MRT-Bildgebung visualisiert werden. Erfolgt die Akkumulation der PFCs im entzündeten Milieu allein aufgrund der anatomischen Gewebeveränderungen des Organismus, so spricht man von einem passiven Targeting. Dieses basiert zum einen auf dem EPR (*enhanced permeability and retention*)-Effekt, welcher eine verstärkte Durchlässigkeit des Endothels für Zellen und Moleküle bis über 400 nm bei zugleich vermindertem lymphatischen Abfluss in einem beschädigten Areal des Körpers beschreibt<sup>82</sup>. Zum anderen beruht das passive Targeting darauf, dass die PFCs durch Phagozytose unspezifisch in Monozyten und Makrophagen als Teil der angeborenen Immunabwehr aufgenommen werden, welche später in den Inflammationsherd einwandern und so detektiert werden können. Welcher Teil des Signals im Entzündungsherd schließlich von

phagozytierenden PFCs und von im Sinne des EPR-Effekts passiv dort akkumulierten PFCs erzeugt wird, ist noch nicht abschließend erforscht. Alternativ erfolgt die Aufnahme durch die Gewebsmakrophagen erst nach dem passiven Übertritt der PFCs ins Gewebe<sup>83</sup>.

Auch Neutrophile Granulozyten werden durch das passive Targeting markiert, jedoch nur im geringen Maße<sup>83,84</sup>. Das Hauptsignal geht wie bereits beschrieben von Monozyten und Makrophagen aus. Matrigel/LPS zeigt auch, dass Neutrophile Granulozyten *in vivo* passiv markiert werden können, jedoch ist das ein Spezialfall<sup>85</sup>. Daher wird das aktive Targeting benötigt, um Neutrophile Granulozyten spezifisch auch in Anwesenheit anderer Zellen zu markieren.

#### **Aktives Targeting von Neutrophilen Granulozyten über CD177**

Werden die PFCs hingegen zusätzlich mit Liganden ausgestattet, beispielsweise mit spezifischen Antikörpern oder Peptiden, sowie einem abschirmenden Mantel aus Polyethylenglykol, um die passive Aufnahme in phagozytische Zellen zu verhindern, kann ein selektives Targeting bestimmter Zellen oder Strukturen, die von besonderem Interesse sind erfolgen<sup>86</sup>. Dieses Prinzip wird als aktives Targeting bezeichnet und stellt die Grundlage dieser Arbeit dar.

2018 wurde an der Montana State University ein Neutrophilen-spezifisches Peptid gefunden, welches an den Oberflächenrezeptor CD177 auf murinen Neutrophilen Granulozyten bindet, diese somit markiert und eine Ansteuerung dieser Zellen möglich macht<sup>62</sup>. Knapp zwei Jahrzehnte zuvor wurde bereits ein humanes Peptid mit gleicher Funktion identifiziertt<sup>87</sup>. CD177 ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Antigen, welches auch als NB1-Glykoprotein bezeichnet wird. Die Funktion von CD177 ist noch nicht gänzlich erforscht<sup>88</sup>. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass es über die Bindung an PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) auf Endothelzellen an der Bindung und schließlich Transmigration von Neutrophilen Granulozyten durch das Endothel beteiligt ist<sup>89,90</sup>. Für CD177 sind aber keine Signalfunktionen bekannt, was es für das Targeting besonders attraktiv macht<sup>40,62</sup>. Denn wichtig bei der Auswahl eines zellspezifischen Liganden ist, dass dieser die Zelle selbst und andere Zellen nicht aktiviert und damit ihr Verhalten nicht beeinflusst. Eine Aktivierung würde Targetingprozesse beeinflussen, ggf. den Krankheitsverlauf verändert und bei der Anwendung in der molekularen Bildgebung die Ergebnisse durch veränderte Zellfunktionen beeinflussen,

weshalb dies bei einem reinen Diagnostikum zu vermeiden ist. Das begründet, weshalb nicht Ly6G als gängiger Marker für Neutrophile Granulozyten zum Einsatz kam. Denn Ly6G wirkt modulierend auf Neutrophile Granulozyten bei der Migration zu Entzündungsherden<sup>91</sup>. CD177 wird in humanen Neutrophilen Granulozyten zu 0 (CD177 negativ) - 100 % exprimiert, abhängig vom Individuum. Bei den meisten Menschen besitzen jedoch 50 % der zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten CD177 auf der Zelloberfläche. Interessant ist beispielsweise die erhöhte Expression von CD177 bei Gebärmutterhalskrebs, entzündlichen Darmerkrankungen oder dem Kawasaki-Syndrom, einer entzündlichen Erkrankung der Arterien, vor allem der des Herzens<sup>92-94</sup>. Für den absoluten Mangel an CD177 wird ein SNP (single nucleotid polymorphismus) 829 in CD177 angenommen. Bei Homozygotie für den SNP 829 fehlt CD1777 vollständig. Bei Heterozygotie liegt das Vorhandensein von CD177 bei etwa 40 %, während bei gesunden Menschen ohne einen SNP 829 in CD177 der Mittelwert für CD177 bei etwa 75 % liegt<sup>95</sup>. Auch ethnische Unterschiede wurden bereits bei der Expression von CD177 vermerkt. So betrage der Anteil von CD177-positiven Neutrophilen bei Europäern 87 – 94 % und bei Chinesen und Japanern 89–99 %<sup>96</sup>. Auch interessant ist, dass weibliche Personen mehr CD177positive Neutrophile besitzen als männliche<sup>96</sup>. Murine Neutrophile Granulozyten hingegen tragen nahezu vollständig den Oberflächenrezeptor CD177. Mäuse eignen sich somit ideal als Versuchstiere zur Untersuchung der Ansteuerung von Neutrophilen über CD17797.

Für das Targeting muriner Neutrophiler Granulozyten selbst wurde in der vorliegenden Arbeit ein Peptid gegen CD177 verwendet. Während Antikörper hohe Affinität und Spezifität gegenüber ihren Antigenen aufweisen, haben sie gleichzeitig den großen Nachteil, eher immunologische Wirtsantworten hervorzurufen als die deutlich kleineren und kürzeren Peptide. Ausnahmen sind humanisierte Antikörper, die zum größten Teil durch humane Sequenzen ersetzt werden. Lediglich die *Complementary Determing Regions* (CDR), also die Antigenbindungstelle bleibt dabei unberührt<sup>98,99</sup>. Peptide sind im Vergleich zu Antikörpern wesentlich günstiger, können in größeren Mengen produziert werden und können zudem durch Modifikationen sehr einfach an PFCs oder andere Transportmoleküle gekoppelt werden<sup>100</sup>. Die Auslösung von immunologischen Wirtsantworten kann daher manchmal nachteilig bei der Verwendung von Antikörpern zur Markierung von zellspezifischen Antigenen sein. Dies ist einer der Gründe, weshalb für das aktive Targeting Peptide bevorzugt werden. Antikörper haben zudem ein hohes Molekulargewicht und zeigen daher eine limitierte Aufnahme ins Gewebe und ein längeres Verweilen im Blut. Sie zeigen zwar höhere Affinitäten zu ihren Antigenen, sind aber teurer als Peptide. Die günstigeren Peptide sind deutlich kleiner als Antikörper. Sie werden schneller aus der Blutbahn geschwemmt und penetrieren auch schneller die Gewebe. Immunologische Wirtsantworten treten seltener auf. Außerdem können sie einfach an PFCs gekoppelt werden, als Antikörper, weshalb sie innerhalb dieser Arbeit eine entscheidende Rolle spielen. Nachteilig bei der Verwendung von Peptiden ist die geringere Affinität an die entsprechenden Antigene. Dieses Problem zeigte sich auch im Laufe dieser Arbeit. Jedoch konnte diese Eigenschaft durch Modifikation des Targetingpeptides beeinflusst werden.

Vorbereitende Versuche mit einem Antikörper gegen das murine CD177 haben bestätigt, dass dieses Oberflächenmolekül geeignet ist, Neutrophile Granulozyten sowohl im Blut als auch im Knochenmark nachzuweisen und diese Zellen von anderen Immunzellen zu unterscheiden (Abb. 6 und 7). Da für das Targeting, wie oben dargelegt, Peptide verwendet werden sollten, wurde anschließend die Bindung des CD177 Peptids an die Neutrophilen Granulozyten an das CD177-Peptid überprüft. Anders als beim Antikörper gegen CD177 zeigte das Peptid keine Bindung an Neutrophile Granulozyten, unabhängig von der Peptidkonzentration (Abb. 9). Dies kann sich ggf. dadurch erklären, dass gegebenenfalls eine größere lokale Dichte an Peptiden erforderlich ist, um diese zu detektieren. Für eine räumliche Dichte mehrerer Peptide wurde ein 8-Arm-PEG-Anker verwendet, welcher in der Lage ist, acht Peptide gleichzeitig zu binden<sup>101</sup>. Analog hierzu kann auf die Publikation von Miettinen et al. aufmerksam gemacht werden, in der das Peptid ebenso an einen Carrier, an Phagen gebunden vorlag<sup>62</sup>. Interessanterweise zeigte sich nach der Inkubation des 8-Arm-PEG-Ankers mit den CD177-Peptiden, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, eine starke Bindungsfähigkeit an Neutrophile Granulozyten (Abb. 13). Ein weiterer relevanter Punkt ist die Frage nach der Internalisierung des Peptids. Innerhalb dieser Arbeit wurde nicht geklärt, ob das Peptid sich nach der initialen Bindung weiterhin nur auf der Oberfläche der Neutrophilen Granulozyten befindet oder ob das Peptid gegebenenfalls sogar durch Endo- oder Phagozytose internalisiert wird<sup>102</sup>. Bouvain hat jedoch 2019 mittels Kopplung an pH-Rodo, einen speziellen Farbstoff für das humane Peptid gegen den CD177-Rezeptor menschlicher Neutrophiler Granulozyten gezeigt, dass eine Internalisierung stattfindet. Dies legt den Schluss nahe, dass auch das murine Peptid eine Internalisierung von CD177 initialisiert, jedoch müssen abschließende Studien diesen Sachverhalt klären.

Im nächsten Schritt wurde das Bindungsverhalten an Neutrophile Granulozyten nach der Kopplung von mNGP an den PFCs untersucht. Es zeigte sich deutlich, dass die <sup>mNGP</sup>PFCs spezifisch von Neutrophilen Granulozyten gebunden werden (Abb. 8). Eine Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Lympho- und Monozyten fällt sehr gering und eher unspezifisch aus, vergleichbar mit der Bindung der <sup>mCon</sup>PFCs. Dies ist insofern besonders relevant, da Monozyten sowie weitere phagozytotische Zellen unspezifisch um das Kontrastmittel, in diesem Fall um die <sup>mNGP</sup>PFCs konkurieren. Je besser also die Bindung und das Aufnahmeverhalten der Neutrophilen Granulozyten an die <sup>mNGP</sup>PFCs, desto stärker wird die unspezifische Aufnahme durch Mono- und Lymphozyten in den Hintergrund gedrängt. Ein Maximum an Bindungsfähigkeit an Neutrophile Granulozyten zeigte sich bei 37 °C nach 20 Minuten Inkubation, die Bindungsfähigkeit nahm daraufhin jedoch wieder ab. Es stellt sich hierbei die Frage, ob die <sup>mNGP</sup>PFCs bei einer Inkubationszeit von 80 Minuten bei 37 °C womöglich instabil werden, dissoziieren oder ihre Bindungseigenschaften verlieren. Eine weitere mögliche Begründung könnte die Stabilität der Fluorochrome sein. Wie bereits in Studien gezeigt wurde, kann es zu einer Degradation der Fluorochrome nach Internalisierung kommen. Da das in Phagosomen/Lysosomen herrschende saure Milieu für Oxidationsprozesse sorgen kann über reaktive Sauerstoffspezies oder andere Oxidantien<sup>103</sup>.

Desweiteren wurde überprüft, inwiefern die Konzentration von mNGP auf der Oberfläche der PFCs einen Einfluss auf das Bindungsverhalten nimmt. Interessanterweise steigt die Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten an, wenn das Verhältnis der mNGPs gegenüber dem vorhandenen Maleimid auf den PFC-Oberflächen geringer ist. Ist die Peptidmenge um ein fünffaches geringer, binden die PFCs am besten an die anzusteuernden Immunzellen (Abb. 9). Bei gleichen Anteilen mNGP und Maleimid auf den PFC-Oberflächen, ist die Bindung an Neutrophilen Granulozyten geringer. Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die PFCs sich bei einem zu hohen Aufkommen von Peptiden auf ihren Oberflächen sterisch gegenseitig behindern, was jedoch den vorangegangenen erfolgreichen Versuchen mit dem 8-Arm-PEG-Anker widersprechen würde.

#### **Targeting von Neutrophilen Granulozyten unter entzündlichen Bedingungen**

Ein Ziel der sich stetig weiterentwickelnden Medizin ist die verstärkte Anwendung nichtinvasiver diagnostischer Methoden. Gerade im Rahmen inflammatorischer Prozesse ist es von entscheidender prognostischer und therapeutischer Bedeutung, frühzeitig Informationen über Vorliegen, Lokalisation, Ausdehnung und Art des Entzündungsprozesses zu haben. Zahlreiche Erkrankungen basieren auf akuten sowie chronischen Entzündungen, wie beispielsweise der Myokardinfarkt<sup>37</sup> oder die Multiple Sklerose<sup>104</sup>. In den vergangenen Jahren wurde für viele weitere Krankheiten ein Zusammenhang zu chronischen Entzündungen hergestellt, in denen auch Neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle spielen, so beispielsweise für die degenerative Alzheimer-Erkrankung<sup>105</sup>, die Adipositas<sup>106</sup> oder auch psychische Erkrankungen wie die Schizophrenie<sup>19,107,108</sup>.

Zu den Zellen, die bei einem akuten inflammatorischen Stimulus als eine der ersten reagieren, gehören die Neutrophilen Granulozyten. Gelangt ein Krankheitserreger in den Organismus, wird es durch phagozytierende Zellen im Gewebe (z. B. Makrophagen) aufgenommen und es werden Moleküle freigesetzt, die u. a. Neutrophile Granulozyten an den Ort der Entzündung migrieren lassen. Gleichzeitig werden Endothelzellen aktiviert, die ihrerseits auch aus der Blutströmung Neutrophile Granulozyten ins Gewebe locken. Mithilfe von NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase und Neutrophilenelastase der Neutrophilen Granulozyten können Pathogene bekämpft werden. Ein weiterer exklusiver Abwehrmechanismus der Neutrophilen Granulozyten ist die Bildung von extrazellulären Netzen (NETose), bestehend aus ihrer DNA. Pathogene werden dabei in Fragmente geteilt und bekämpft. Wie wichtig Neutrophile Granulozyten für den Organismus sind, zeigt sich in Patienten, die über keine Neutrophile Granulozyten besitzen, also neutropen sind. Diese Patienten haben ein hohes Risiko für (bakterielle) Infektionen, je niedriger die Anzahl ihrer Neutrophilen Granulozyten ist. Es gibt unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe und diverse Begleitsymptome. V. a. Frühgeborene mit Neutropenie haben ein höheres Risiko für Omphalitis, Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis und Meningitis. Bei einigen kongenitalen, also angeborenen Neutropenien können keine reifen Granulozyten gebildet werden. Diese Kinder leider häufig unter schweren, zum Teil lebenslimitierenden Infektionen. Dahingegen haben Patienten mit erworbener Autoimmunneutropenie seltener ein erhöhtes Infektionsrisiko. Das Infektionsrisiko steigt grundsätzlich altersunabhängig weiter, wenn die Neutrophilenzahlen länger als drei Tage niedrig bleiben. Eine spezielle Form der Neutropenie stellt die Zyklische Neutropenie dar, eine autosomal-dominate Erbrankheit. Die Neutrophilenzahl folgt dabei einem 21-Tage-Zyklus. Während des Zyklus leiden die Patienten häufig an Stomatitiden, Lymphadenopathien oder Hautabszessen<sup>12,109</sup>.

Um den Einfluss entzündlicher Bedingungen auf das Targeting zu untersuchen, wurde Mäusen subkutan ein LPS/Matrigel-Gel implantiert. LPS gehört zu den *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) und ist in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, beispielweise bei *Salmonella*, enthalten. Es wirkt dort als Endotoxin, wird also nicht sezerniert. Dringen gramnegative Bakterien in den Körper ein und werden anschließend von Immunzellen erkannt und eliminiert, wird LPS aus den degradierten Bakterien freigesetzt, welches im Organismus toxisch wirkt<sup>110</sup>. Es aktiviert Monozyten und Makrophagen, die hierauf Entzündungsfaktoren freisetzen. Die Folge sind lokale oder systemische Entzündungen mit Symptomen wie Fieber, Hautausschläge, Schmerzen sowie Blutungen. Auch septische Schockzustände sind bei einer zu hohen Konzentration an LPS im Organismus möglich<sup>2,18,111</sup>. Beim Matrigel handelt es sich um rekonstruierte Basalmembranstrukturen muriner Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Sarkome<sup>112</sup>. Es dient als dreidimensionale raumgebende Struktur für die LPS-Depots und wird, da es sich um homologes Material handelt von den Immunzellen der Mäuse nicht erkannt oder abgestoßen<sup>85</sup>. Erst das enthaltene LPS initiiert eine Immunreaktion.

24 Stunden nach Implantation der LPS-Matrigele zeigte sich nach Blutentnahme und Inkubation der Immunzellen mit den <sup>mNGP</sup>PFCs eine verstärkte Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten (Abb. 10). Interessant ist, dass sich dieses Verhalten nur bei Neutrophilen Granulozyten zeigt, nicht aber bei Mono- oder Lymphozyten, was die Spezifität unterstreicht. Die vermehrte Bindung an Neutrophile Granulozyten erklärt sich durch eine stärkere Expression von CD177 auf den Oberflächen der Neutrophilen Granulozyten bei bakterieller Inflammation. Eine Hochregulation von CD177 kann ebenso nach Behandlung mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) erreicht werden<sup>96,113,114</sup>.

In der Literatur ist bekannt, dass der Grad der Inflammation in den Mäusen nach 24 Stunden am höchsten ist und danach über 20 Tage stetig abnimmt, weshalb die Zellisolation mit folgenden Inkubationen mit den PFCs in dieser Studie stets 24 Stunden nach Implantation der LPS-Matrigel-Modelle durchgeführt werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen<sup>85</sup>.

### Einfluss der <sup>mNGP</sup>PFC-Partikelgrößen auf die Darstellung von Neutrophilen

Um herauszufinden, welche Partikelgrößen ein Targeting von murinen Neutrophilen am effizientesten ermöglichen, wurden durch Variation der Konzentration ihrer Komponente verschieden große <sup>mNGP</sup>PFCs hergestellt (Tabelle 8). Die <sup>mNGP</sup>PFCs mit den Größen <sup>150nm</sup>PFC, <sup>350nm</sup>PFC und <sup>500nm</sup>PFC wurden anschließend charakterisiert und ihr Bindungsverhalten an Neutrophilen Granulozyten wurde untersucht.

Unter Verwendung der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnten Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Oberflächenpotential ermittelt werden. Die Messungen zeigten Werte, die mit Werten vergleichbarer Partikel in eigenen Vorversuchen sowie aus der Literatur übereinstimmen (Abb. 14). Der PDI zeigte sich größer, je größer die Partikel wurden. Größere Partikelgrößen zeigen eine breitere Größenverteilung innerhalb der Emulsion und sind daher inhomogener. Zum Oberflächenpotential kann gesagt werden, dass Partikel, welche tendenziell eine positivere Oberfläche haben, von den meisten Zelltypen besser internalisiert werden können als jene mit negativen Oberflächenladungen. Dies liegt daran, dass Zellmembranen durch ihr anionisches Membranpotential besser positive Ladungen binden können<sup>115</sup>. Anschließend wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Diese zeigten jedoch in den <sup>500nm</sup>PFCs unerwartet eine geringe Fluoreszenz (Abb. 15). Diese änderte sich auch nicht bei Fluoreszenzmessungen unmittelbar nach dem Auftauen von direkt nach der Herstellung eingefrorener <sup>500nm</sup>PFCs, was durchgeführt wurde, um eine Degradation bei Lagerung zu verhindern.

Bei der Herstellung von PFCs müssen Lagerungszeiten beachtet werden, denn es ist beschrieben, dass bei Verwahrung von PFCs und anderen Emulsionen bei Raumtemperatur verschiedene Formen der Degradation auftreten, welche die Stabilität und Nutzbarkeit der PFCs beeinflussen<sup>116,117</sup>. Zum einen sind Phospholipide anfällig für Hydrolyse und Oxidation und

zum anderen sind Nanoemulsionen nur bedingt stabil. Abbildung 22 zeigt zwei Prozesse, durch welche es zum Zerfall der Nanoemulsionen kommt. Hierbei handelt es sich um die Ostwaldreifung sowie die Koaleszenz. Bei der Ostwald-Reifung kommt es durch Dampfdruckunterschiede und Diffusionsvorgänge zu einer stetigen Vergrößerung der großen Partikel, wohingegen die kleineren Partikel kleiner werden. Die Koaleszenz beschreibt den Vorgang der Fusion zweier Emulsionspartikel zu einem größeren Emulsionspartikel, unter Abschnürung von leeren Liposomen, welche keine PFCs enthalten und die Stabilität von Nanoemulsionen beeinträchtigen<sup>118,119</sup>.



Abb. 22: Schematische Darstellung des Zerfalls von Emulsionen bei Lagerung. Links dargestellt ist die Ostwaldreifung: Die großen Partikel werden mit der Zeit durch Dampfdruckunterschiede größer, während die kleinen Partikel weiter an Größe abnehmen. Infolgedessen nimmt auch die Anzahl an verfügbaren Tröpfchen ab. Auf der rechten Seite ist der Vorgang der Koaleszenz zu erkennen: Zwei oder mehr kleinere Partikel fusionieren beim Zusammentreffen unter Abschnürung von leeren Liposomen miteinander zu einem großen Partikel. Die Oberfläche der Tröpfchen wird hierdurch insgesamt verkleinert.

Der Grund für die geringe Fluoreszenz, die in unserer Arbeitsgruppe auch bereits in anderen großen PFCs (226 nm, Farbstoff Cy5) beobachtet worden war, blieb somit ungeklärt<sup>120</sup>. Die geringen Fluoreszenzwerte könnten ein Resultat abnehmender Stabilität der PFCs aufgrund der großen Partikelgröße sein. Um unter diesen Umständen aussagekräftigere Werte zu erhalten, könnten bei entsprechenden Fluoreszenzmessungen mittels Durchflusszytometrie die erhaltenen Werte auf das Niveau der beiden anderen Emulsionen angepasst werden. Das wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gemacht. Gründe für eine Verringerung der Fluoreszenzintensität können vielfältig sein. Man spricht dabei von Quenching, welches sich grob in zwei Formen einteilen lässt. Das dynamische Quenching und das statische Quenching. Ersteres ist zeitabhängig und findet während des angeregten Zustandes des Fluorophors statt. Hierbei

kommt es zu unerwünschten Elektronentransfers oder Orbitalwechselwirkungen. Letzteres kann bereits im Grundzustand auftreten, z. B. durch Komplexbildung, ist also nicht zeitabhängig. Bei niedrigen Temperaturen kann das Quenching minimiert werden<sup>121-123</sup>.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Charakterisierungen nur mittels DLS und Fluoreszenzmessung durchgeführt. Selbstverständlich existieren noch weitere Methoden, um Partikel zu charakterisieren. So kann zum Beispiel mit Hilfe der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) der Anteil an Liposomen innerhalb der PFCs bestimmt werden. Die Kryo-TEM hat sich als bewährte Methode für die Untersuchung von Liposomen etabliert und kann Bilder mit bis zu 300.000-facher Vergrößerung und einer Auflösung von 4 - 5 nm generieren<sup>40,124-126</sup>.

Grundsätzlich werden Aufnahmen von Nanopartikeln in einem Größenrahmen von 50 – 750 nm in verschiedenen Zelllinien beobachtet<sup>82</sup>. Dies haben exemplarisch Grapentin *et al.* in einem Versuch mit PFC-Nanoemulsionen gezeigt. Partikel mit einer Größe unter 200 nm wurden nur in einem geringen Umfang aufgenommen und phagozytiert, während die Aufnahme größerer Partikel bis etwa 300 nm stetig zunahm<sup>56</sup>. Allerdings werden Zellen durch größere Partikel auch schneller aktiviert, was man bei einem Zelltargeting jedoch vermeiden möchte<sup>40,115</sup>. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Literatur eine interessante Abhängigkeit der Bluthalbwertszeit von Nanopartikeln von ihrer Partikelgröße zeigt. Kleinere Partikel haben eine tendenziell längere Halbwertszeit im Blut, während größere Partikel schneller von phagozytischen Immunzellen im Blut sowie im Gewebe aufgenommen werden und somit aus der Blutbahn eliminiert werden<sup>120</sup>.

<sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs wurden ausschließlich an Neutrophilen Granulozyten gebunden und es zeigte sich ein deutlich besseres Signal der <sup>350nm</sup>PFCs im Vergleich zu den <sup>150nm</sup>PFCs und den <sup>500nm</sup>PFCs. Eine Internalisierung der Emulsionen wurde innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht. Ihre Bindung wurde erneut in Blut, aber auch in Knochenmark sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand sowie bei LPS-Stimulation der Tiere zusätzlich im mit LPS versetzten Matrigel untersucht. Beim Vorliegen eines inflammatorischen

Prozesses zeigt sich eine verstärkte Bindung der <sup>350nm</sup>PFCs an die in das Matrigel eingewanderten Neutrophilen Granulozyten verglichen mit Blut nativer Mäuse.

Die Messung des <sup>19</sup>F-Gehalts von Neutrophilen Granulozyten nach *ex vivo* aus murinem Knochenmark mit <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs am MRT zeigte sowohl im gesunden als auch im LPS-stimulierten Zustand einen höheren <sup>19</sup>F-Gehalt, wenn die Neutrophilen Granulozyten mit den <sup>350nm</sup>PFCs inkubiert wurden. Dies unterstreicht erneut das gute Bindungsverhalten der <sup>350nm</sup>PFCs. Es ist aufgrund der vorangegangenen Fluoreszenz- sowie DLS-Messungen anzunehmen, dass das geringere Signal der <sup>500nm</sup>PFCs aufgrund eines Stabilitätsverlustes dieser größten der untersuchten <sup>mNGP</sup>PFCs über die Zeit hinweg zustande kommt.

Auch in *in vivo*-Modellen wurde die zelluläre Bindung der <sup>mNGP</sup>PFCs demonstriert. Wurden <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs intravenös appliziert, zeigte sich Blut sowie im Knochenmark ebenfalls eine bessere Bindung der <sup>350nm</sup>PFCs an die Neutrophilen Granulozyten (Abb. 20). Dieser Effekt wurde durch die Stimulation mittels des Matrigel-LPS-Modells noch weiter verstärkt. Aufgrund dieses überlegenen Bindungsverhaltens der <sup>350nm</sup>PFCs eignen sich diese von den untersuchten <sup>mNGP</sup>PFCs am besten für die Bildgebung entzündlicher Prozesse durch die Markierung Neutrophiler Granulozyten.

Nachdem gezeigt wurde, dass von den <sup>150nm</sup>PFCs, <sup>350nm</sup>PFCs und <sup>500nm</sup>PFCs die <sup>350nm</sup>PFCs das Beste Bindungsverhalten an Neutrophile Granulozyten aufweisen, wurde schließlich noch gezeigt, die Darstellung eines entzündlichen Areals in Mäusen, denen subkutan Matrigel mit LPS implantiert wurde durch intravenöse Injektion von <sup>350nm</sup>PFCs als Kontrastmittel in der MRT-Bildgebung möglich ist. Die überlagerten <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-Bilder (Abb. 21) der Kontrollmaus zeigen, dass Fluorsignale in Lymphbahnen- und Lymphknoten sowie in Knochen zu erkennen sind. Diese Signale sind unspezifisch und stellen den lymphatischen Abtransport der <sup>mCon</sup>PFCs dar. Entsprechend zeigt die Maus, welcher die spezifischen <sup>350nm</sup>PFCs gespritzt wurden, im MRT deutliche Fluorsignale im Bereich des Matrigels. Dies lässt sich auf die in die Herdregion eingewanderten Neutrophilen Granulozyten zurückführen, welche somit erfolgreich über eine Bindung der <sup>350nm</sup>PFCs visualisiert werden konnten.

#### Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die Kopplung eines Peptides an PFCs, welches gegen das Oberflächenmolekül CD177 gerichtet ist, war es innerhalb dieser Arbeit möglich über <sup>mNGP</sup>PFCs spezifisch murine Neutrophile Granulozyten mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F MRT sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sichtbar zu machen. Es hat sich zudem gezeigt, dass die Bindung von <sup>mNGP</sup>PFCs an Neutrophile Granulozyten durch inflammatorische Prozesse verstärkt wird, was sich auf eine verstärkte Oberflächenexpression von CD177 auf den Neutrophilen Granulozyten zurückführen ließ. Ferner wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine optimale Beladung der Neutrophilen Granulozyten, durch den Einsatz einer bestimmte Menge an mNGP, als auch durch einen hydrodynamischen Durchmesser der PFCs von 350 nm erreicht wurde. Eine Besonderheit der <sup>19</sup>F MRT ist, dass durch Überlagerung der <sup>19</sup>F Bilder mit ortsgleichen anatomischen <sup>1</sup>H-Bildern, die detektierten Fluor-Hotspots adäquat in ihren anatomischen Kontext eingeordnet werden können. Ein weiterer Vorteil der <sup>19</sup>F-Bildgebung ist die Quantifizierbarkeit des <sup>19</sup>F-Signals, die in direktem Verhältnis zur Menge der vorhandenen Fluorspins und somit der Menge der aufgenommen PFCs ist, wodurch es z.B. möglich ist das Ausmaß der Entzündungsreaktion zu bestimmen.

Das aktive Targeting von Neutrophilen Granulozyten mittels PFCs stellt einen vielversprechenden Ansatz für eine schnellere, minimalinvasive, nebenwirkungsärmere und exaktere Bildgebung inflammatorischer Prozesse dar. Es vereinfacht die Diagnostik sowie die Prognosestellung und lässt zellspezifische Therapieplanungen zu. Gerade bei tiefen, baktierellen Infektionen (Abszessen, Empyemen oder Phlegmonen) wäre ein Imaging von Neutrophilen Granulozyten von Vorteil. Auch bei älteren, multimorbiden Patienten, könnte eine Bildgebung vorab Rückschlüsse auf den Therapieansatz und -erfolg geben.

Mit Hilfe verschiedener PFCs können zudem durch die *in vivo* Multicolor-Bildgebung über den Einsatz verschiedener Perfluorkarbone mit versetzten <sup>19</sup>F-Peaks im MRT, mehrere Zellgruppen oder -populationen angesteuert werden<sup>127</sup>. Zwar waren Neutrophile Granulozyten aufgrund ihrer besonderen Stellung in Auslösung von Inflammation sowie Heilung Mittelpunkt dieser Arbeit, jedoch können selbstverständlich auch andere Zellen mittels aktiven Zelltargetings

angesteuert und via MRT-Bildgebung dargestellt werden. Zudem können ebenso auch andere bildgebende Verfahren für ein Targeting eingesetzt werden.

Das aktive Targeting nimmt zudem im Rahmen der Krebsforschung einen hohen Stellenwert ein. So können Tumorzellen markiert, dargestellt und anschließend durch die gezielte Anlieferung von spezifischen Wirkstoffen sogar eliminiert werden (Theranostics)<sup>128-130</sup>. Hierdurch wird deutlich, dass das aktive Zelltargeting nicht allein in der Diagnostik eine sehr große Rolle spielt, sondern auch im therapeutischen Bereich einen starken Einfluss auf die Weiterentwicklung der Bekämpfungsmöglichkeiten von Erkrankungen nehmen kann. Hier kann das Konzept der Theranostik erwähnt werden, welches simultan über die gleichen Mechanismen erfolgende Diagnostik und Therapie darstellt. Dieser Begriff wird zunehmend in der Nuklearmedizin verwendet. Ein prominentes Beispiel in der Theranostik ist die Markierung sowie die Therapie des Schilddrüsenkarzinoms mittels Radiojod (131J)131,132. D. h., die Substanzen, die dazu dienen, in die pathologischen Strukturen in der Bildgebung zu detektieren, dienen gleichzeitig der zielgerichteten Anlieferung von Therapeutika: Krebszellen werden durch radioaktivmarkierte Liganden gebunden und können mit einem diagnostischen oder einem therapeutischen Strahler markiert werden. Das Resultat ist gleichzeitig eine spezifische Bildgebung und Arzneimittelanlieferung<sup>133</sup>. Mit unserem Ansatz kann natürlich auch theranostisch an Neutrophile Granulozyten herangetreten werden. Die Einwanderung dieser könnte medikamentös gehemmt oder stimuliert werden, genau wie die Funktion dieser Zellen.

Interessant wären sicherlich zudem weitere Versuche mit Perfluoroktylbromid (PFOB) statt mit Perfluorkronenether (PFCE). Während das PFCE in der Grundlagenforschung durch die hohe Sensitivität das Mittel der Wahl ist, empfiehlt sich für die klinische Anwendung vor allem das PFOB, welches eine kürzere Halbwertszeit von etwa 12 Tagen hat und über die Atemluft ausgeschieden wird<sup>39,134</sup>.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Lucignani, G. Rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa... or molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **34**, 2135-2141 (2007). https://doi.org:10.1007/s00259-007-0617-9
- 2 Bröker, B. *Grundwissen Immunologie*. 4th ed. 2019 edn, (Springer Berlin Heidelberg, 2019).
- 3 Egger, G. Die Akute Entzündung : Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität [Elektronische Ressource]. (Springer-Verlag/Wien, 2005).
- 4 Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. & Kono, H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28, 321-342 (2010). <u>https://doi.org:10.1146/annurev-immunol-030409-101311</u>
- 5 Stark, K. Mechanismen der sterilen Inflammation bei kardiovaskulären Erkrankungen. (2019). https://doi.org:10.5282/edoc.25561
- 6 Mestas, J. & Hughes, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* **172**, 2731-2738 (2004). <u>https://doi.org:10.4049/jimmunol.172.5.2731</u>
- 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). <u>https://doi.org:10.1146/annurev-immunol-020711-074942</u>
- 8 Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625-627 (2010). <u>https://doi.org:10.1182/blood-2010-01-259028</u>
- 9 Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A. & Weber, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 17, 248-261 (2017). https://doi.org:10.1038/nri.2017.10
- 10 Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-670 (2010). https://doi.org:10.1016/j.immuni.2010.11.011
- 11 Lakshman, R. & Finn, A. Neutrophil disorders and their management. *Journal of Clinical Pathology* 54, 7 (2001). <u>https://doi.org:10.1136/jcp.54.1.7</u>
- 12 Newburger, P. E. Disorders of Neutrophil Number and Function. *Hematology* **2006**, 104-110 (2006). <u>https://doi.org:10.1182/asheducation-2006.1.104</u>
- 13 Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175 (2013). <u>https://doi.org:10.1038/nri3399</u>
- 14 Mesa, M. A. & Vasquez, G. NETosis. *Autoimmune Diseases* **2013**, 651497 (2013). https://doi.org:10.1155/2013/651497
- 15 Wang, J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research* **371**, 531-539 (2018). <u>https://doi.org:10.1007/s00441-017-2785-7</u>
- 16 Shim, H. B., Deniset, J. F. & Kubes, P. Neutrophils in homeostasis and tissue repair. *Int Immunol* **34**, 399-407 (2022). <u>https://doi.org:10.1093/intimm/dxac029</u>
- 17 Elliott, M. R., Koster, K. M. & Murphy, P. S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *The Journal of Immunology* **198**, 1387-1394 (2017).
- 18 Murphy, K. *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. 2018 edn, (Springer Berlin Heidelberg, 2018).
- 19 Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O. & Kenne, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. Cellular & Molecular Immunology 19, 177-191 (2022). <u>https://doi.org:10.1038/s41423-021-00832-3</u>
- 20 DiPietro, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* **4**, 233-240 (1995).
- 21 Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 13, 159-175 (2013). <u>https://doi.org:10.1038/nri3399</u>

- 22 Fournier, B. M. & Parkos, C. A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* **5**, 354-366 (2012). <u>https://doi.org:10.1038/mi.2012.24</u>
- 23 Dovi, J. V., Szpaderska, A. M. & DiPietro, L. A. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thrombosis and haemostasis* **92**, 275-280 (2004).
- 24 Zhu, S. *et al.* The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing. *Cell Death* & *Disease* **12**, 984 (2021). <u>https://doi.org:10.1038/s41419-021-04294-3</u>
- 25 Sabbatini, M., Magnelli, V. & Renò, F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells* **10**, 494 (2021).
- Zilch, H. O., N.; Kett, H.; Breit, A. 1. 7 Magnetische Resonanz Tomographie (MRT)(Kernspintomographie). Weibliches Genitale Mamma · Geburtshilfe: Diagnostik mit bildgebenden Verfahren, 41 (2013).
- 27 Weishaupt, D. *Wie funktioniert MRI? : Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung [Elektronische Ressource]*. 7., überarb. u. erg. Aufl. 2014 edn, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
- 28 Möller, H. E. in *Ganzkörper-MR-Tomographie* 2-23 (Thieme, 2006).
- 29 Kremers, C. in *Basiswissen Radiologie: Nuklearmedizin und Strahlentherapie* (eds Martina Kahl-Scholz & Christel Vockelmann) 55-70 (Springer Berlin Heidelberg, 2017).
- 30 Hammerstingl, R., Schwarz, W., Hochmuth, K. et al. Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie von Lebermetastasen: Positive versus negative Kontrastmittel. *Radiologe* **41**, 24-39 (2001). <u>https://doi.org/10.1007/s001170050924</u>
- 31 Costelloe, C. M., Amini, B. & Madewell, J. E. Risks and Benefits of Gadolinium-Based Contrast-Enhanced MRI. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* **41**, 170-182 (2020). https://doi.org/10.1053/j.sult.2019.12.005
- 32 Heverhagen, J. T. & Knopp, M. V. Gadolinium Retention in the Brain: What Do We Need to Consider for Clinical Use? *Investigative Radiology* **54**, 466-467 (2019). https://doi.org:10.1097/rli.00000000000589
- 33 Dulińska-Litewka, J. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles—Current and Prospective Medical Applications. *Materials* **12**, 617 (2019).
- 34 Wahajuddin & Arora, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 7, 3445-3471 (2012). <u>https://doi.org:10.2147/IJN.S30320</u>
- 35 Reinländer, C. MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark. [Electronic ed.] edn, (2003).
- Riess, J. G. Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 33, 47-63 (2005). <u>https://doi.org:10.1081/bio-200046659</u>
- Flogel, U. *et al.* In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 118, 140-148 (2008).
  <a href="https://doi.org:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890">https://doi.org:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890</a>
- 38 Steenland, K., Fletcher, T. & Savitz, D. A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ Health Perspect* **118**, 1100-1108 (2010). <u>https://doi.org:10.1289/ehp.0901827</u>
- 39 Long, D. M. et al. An Overview of Perfluoroctylbromide—Application as a Synthetic Oxygen Carrier and Imaging Agent for X-Ray, Ultrasound and Nuclear Magnetic Resonance. Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs 16, 411-420 (1988). https://doi.org:10.3109/10731198809132591
- 40 Bouvain, P. Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht-invasiver 19F-MR-Bildgebung [Hochschulschrift]. (2019).
- 41 Lowe, K. C. Perfluorocarbons as Oxygen-Transport Fluids. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **87**, 825-838 (1987). <u>https://doi.org:Doi</u> 10.1016/0300-9629(87)90001-6

- 42 Diaz-Lopez, R., Tsapis, N. & Fattal, E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI. *Pharm Res* 27, 1-16 (2010). <u>https://doi.org:10.1007/s11095-009-0001-5</u>
- 43 Mollet, H. Formulierungstechnik : Emulsionen, Suspensionen, feste Formen [Elektronische Ressource]. (Wiley-VCH, 1999).
- 44 Bancroft, W. D. The theory of emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry* **17**, 501-519 (2002).
- 45 Lauth, G. J. & Kowalczyk, J. in *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide* 421-425 (Springer, 2016).
- 46 Langer, K. Nanotechnologie bringt Arzneistoffe sicher ans Ziel : bessere Wirkung bei reduzierter Nebenwirkung. *Forschung Frankfurt : Wissenschaftsmagazin der Goethe-Universität* **24**, 48-51 (2006).
- 47 Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. & Allémann, E. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93**, 1980-1992 (2004). <u>https://doi.org/10.1002/jps.20098</u>
- 48 Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**, 6387-6392 (1986).
- 49 Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced drug delivery reviews* 63, 136-151 (2010). https://doi.org:10.1016/j.addr.2010.04.009
- 50 Azzopardi, E., Ferguson, E. & Thomas, D. The enhanced permeability retention effect: A new paradigm for drug targeting in infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68** (2012). <u>https://doi.org:10.1093/jac/dks379</u>
- 51 Temme, S. *et al.* Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by 19F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation* **131**, 1405-1414 (2015). <u>https://doi.org:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010962</u>
- 52 Bamezai, A. Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **52**, 255-266 (2004).
- 53 Kazuo Ohashi, M. D., Ph.D., Takashi Yokoyama, M.D., Yoshiyuki Nakajima, M.D., Ph.D., and Marshall Kosovsky, Ph.D. Methods for Implantation of Matrigel Matrix into Mice Tissue Fixation. (2013).
- 54 Hughes, C. S., Postovit, L. M. & Lajoie, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886-1890 (2010). https://doi.org:10.1002/pmic.200900758
- 55 Amend, S. R., Valkenburg, K. C. & Pienta, K. J. Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *J Vis Exp*, 53936 (2016). <u>https://doi.org:10.3791/53936</u>
- 56 Grapentin, C. *et al.* Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by 19F MRI. *Nanomedicine* **2014**, 268-286 (2014).
- 57 Schöttler, S. *et al.* Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nature Nanotechnology* **11**, 372-377 (2016). https://doi.org:10.1038/nnano.2015.330
- 58 Stang, M., Schuchmann, H. & Schubert, H. Emulsification in High-Pressure Homogenizers. *Engineering in Life Sciences* 1, 151-157 (2001). <u>https://doi.org/10.1002/1618-2863(200110)1:4</u><151::AID-ELSC151>3.0.CO;2-D
- 59 Håkansson, A. Emulsion Formation by Homogenization: Current Understanding and Future Perspectives. *Annual Review of Food Science and Technology* **10**, 239-258 (2019). https://doi.org:10.1146/annurev-food-032818-121501
- 60 Goldburg, W. I. Dynamic light scattering. *American Journal of Physics* **67**, 1152-1160 (1999). https://doi.org:10.1119/1.19101
- 61 Schmitz, K. S. Introduction to dynamic light scattering by macromolecules. (Elsevier, 2012).

- 62 Miettinen, H. M., Gripentrog, J. M., Lord, C. I. & Nagy, J. O. CD177-mediated nanoparticle targeting of human and mouse neutrophils. *PLOS ONE* **13**, e0200444 (2018). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0200444
- 63 Ibrahim, M. A., Hazhirkarzar, B. & Dublin, A. B. in *StatPearls* (StatPearls PublishingCopyright © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020).
- 64 Spahn, D. R. & Kocian, R. Artificial O2 carriers: status in 2005. *Curr Pharm Des* **11**, 4099-4114 (2005). <u>https://doi.org:10.2174/138161205774913354</u>
- 65 Woolen, S. A. *et al.* Risk of Nephrogenic Systemic Fibrosis in Patients With Stage 4 or 5 Chronic Kidney Disease Receiving a Group II Gadolinium-Based Contrast Agent: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Internal Medicine* **180**, 223-230 (2020). https://doi.org:10.1001/jamainternmed.2019.5284
- 66 Thurman, J. M. & Serkova, N. J. Nanosized contrast agents to noninvasively detect kidney inflammation by magnetic resonance imaging. *Adv Chronic Kidney Dis* **20**, 488-499 (2013). https://doi.org:10.1053/j.ackd.2013.06.001
- 67 Grobner, T. Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant* **21**, 1104-1108 (2006). <u>https://doi.org:10.1093/ndt/gfk062</u>
- 68 Kanda, T. *et al.* Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* 276, 228-232 (2015). https://doi.org:10.1148/radiol.2015142690
- 69 Kanda, T., Ishii, K., Kawaguchi, H., Kitajima, K. & Takenaka, D. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology* 270, 834-841 (2014). <u>https://doi.org:10.1148/radiol.13131669</u>
- 70 McDonald, R. J. *et al.* Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* **275**, 772-782 (2015). <u>https://doi.org:10.1148/radiol.15150025</u>
- 71 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). <u>https://doi.org:10.1097/rli.000000000000072</u>
- 72 Wang, Z., Li, J., Cho, J. & Malik, A. B. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. *Nature Nanotechnology* **9**, 204-210 (2014). https://doi.org:10.1038/nnano.2014.17
- 73 Krieg, F. M., Andres, R. Y. & Winterhalter, K. H. Superparamagnetically labelled neutrophils as potential abscess-specific contrast agent for MRI. *Magnetic Resonance Imaging* **13**, 393-400 (1995). <u>https://doi.org/10.1016/0730-725X(94)00111-F</u>
- 74 Welling, M. M. *et al.* Imaging of bacterial infections with 99mTc-labeled human neutrophil peptide-1. *J Nucl Med* **40**, 2073-2080 (1999).
- 75 Quintel, M., Meinhardt, J. & Waschke, K. F. Partielle Flüssigkeitsventilation (partial liquid ventilation). *Der Anaesthesist* **47**, 479-489 (1998). <u>https://doi.org:10.1007/s001010050586</u>
- 76 Leach, C. L. *et al.* Partial Liquid Ventilation with Perflubron in Premature Infants with Severe Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 335, 761-767 (1996). <u>https://doi.org:10.1056/nejm199609123351101</u>
- 77 Greenspan, J. S., Wolfson, M. R., Rubenstein, S. D. & Shaffer, T. H. Liquid ventilation of human preterm neonates. *J Pediatr* 117, 106-111 (1990). <u>https://doi.org:10.1016/s0022-3476(05)82457-6</u>
- Kaneda, M. M., Caruthers, S., Lanza, G. M. & Wickline, S. A. Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. *Ann Biomed Eng* 37, 1922-1933 (2009). <a href="https://doi.org/10.1007/s10439-009-9643-z">https://doi.org/10.1007/s10439-009-9643-z</a>

- 79 Bae, P. K. *et al.* Bimodal Perfluorocarbon Nanoemulsions for Nasopharyngeal Carcinoma Targeting. *Molecular Imaging and Biology* 15, 401-410 (2013). <u>https://doi.org:10.1007/s11307-013-0622-2</u>
- 80 Taves, D. R. Normal Human Serum Fluoride Concentrations. *Nature* **211**, 192-193 (1966). <u>https://doi.org:10.1038/211192b0</u>
- 81 Chapelin, F., Capitini, C. M. & Ahrens, E. T. Fluorine-19 MRI for detection and quantification of immune cell therapy for cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **6**, 105 (2018). https://doi.org:10.1186/s40425-018-0416-9
- 82 Baumann, D. K. Nanopartikel und Nanokapseln als potentielle Wirkstofftransportsysteme: Zelluläre Aufnahme in Leukozyten in peripherem Vollblut und in Zellkultur, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (2012).
- 83 Temme, S., Bönner, F., Schrader, J. & Flögel, U. 19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 4, 329-343 (2012). <u>https://doi.org/10.1002/wnan.1163</u>
- 84 Ebner, B. *et al.* Early Assessment of Pulmonary Inflammation by <sup>19</sup>F MRI In Vivo. *Circulation: Cardiovascular Imaging* **3**, 202-210 (2010). https://doi.org:doi:10.1161/CIRCIMAGING.109.902312
- 85 Temme, S. *et al.* Technical Advance: Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *Journal of Leukocyte Biology* **95**, 689-697 (2014). <u>https://doi.org/10.1189/jlb.0113032</u>
- 86 Torchilin, V. P. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handb Exp Pharmacol*, 3-53 (2010). <u>https://doi.org:10.1007/978-3-642-00477-3\_1</u>
- 87 Mazzucchelli, L. *et al.* Cell-Specific Peptide Binding by Human Neutrophils. *Blood* **93**, 1738-1748 (1999). <u>https://doi.org:10.1182/blood.V93.5.1738</u>
- 88 Grieshaber-Bouyer, R. & Nigrovic, P. A. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front Immunol* 10, 346 (2019). https://doi.org:10.3389/fimmu.2019.00346
- Bai, M. *et al.* CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* 130, 2092-2100 (2017). https://doi.org:10.1182/blood-2017-03-768507
- 90 Kuckleburg, C. J., Tilkens, S. B., Santoso, S. & Newman, P. J. Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188, 2419-2426 (2012). <u>https://doi.org:10.4049/jimmunol.1102540</u>
- 91 Wang, J. X. *et al.* Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a β2-integrin-dependent mechanism. *Blood* **120**, 1489-1498 (2012). <u>https://doi.org:10.1182/blood-2012-01-404046</u>
- 92 Huang, Y.-H., Lo, M.-H., Cai, X.-Y., Liu, S.-F. & Kuo, H.-C. Increase expression of CD177 in Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology* 17, 13 (2019). <u>https://doi.org:10.1186/s12969-019-0315-8</u>
- Zhou, G. *et al.* CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* 67, 1052-1063 (2018). <u>https://doi.org:10.1136/gutjnl-2016-313535</u>
- 94 Liao, W. et al. Diagnostic, prognostic, and immunological roles of CD177 in cervical cancer. J Cancer Res Clin Oncol 149, 173-189 (2023). <u>https://doi.org:10.1007/s00432-022-04465-5</u>
- 95 Cowland, J. B. & Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews* 273, 11-28 (2016). <u>https://doi.org/10.1111/imr.12440</u>
- Göhring, K. *et al.* Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *British Journal of Haematology* 126, 252-254 (2004). <a href="https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05027.x">https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05027.x</a>
- Goldschmeding, R. *et al.* Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56–62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *British Journal of Haematology* 81, 336-345 (1992).
  <a href="https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb08237.x">https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb08237.x</a>

80

- 98 Ochsenbein, A. F. Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen. *Schweiz Med Forum* **8**, 140-143 (2008).
- 99 Weiner, L. M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* **29**, 1-9 (2006). https://doi.org:10.1097/01.cji.0000192105.24583.83
- 100 Trier, N., Hansen, P. & Houen, G. Peptides, Antibodies, Peptide Antibodies and More. Int J Mol Sci 20, 6289 (2019). <u>https://doi.org:10.3390/ijms20246289</u>
- Qi, F., Hu, C., Yu, W. & Hu, T. Conjugation with Eight-Arm PEG Markedly Improves the In Vitro Activity and Prolongs the Blood Circulation of Staphylokinase. *Bioconjugate Chemistry* 29, 451-458 (2018). <u>https://doi.org:10.1021/acs.bioconjchem.7b00770</u>
- 102 Müller-Stoy, G. Zelluläre Internalisierung von Mikropartikeln, lmu, (2013).
- 103 Bouvain, P. *et al.* Dissociation of (19)F and fluorescence signal upon cellular uptake of dualcontrast perfluorocarbon nanoemulsions. *MAGMA* 32, 133-145 (2019). <u>https://doi.org:10.1007/s10334-018-0723-7</u>
- 104 Brück, W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *Journal of Neurology* **252**, v3-v9 (2005). https://doi.org:10.1007/s00415-005-5002-7
- 105 Walker, K. A., Ficek, B. N. & Westbrook, R. Understanding the Role of Systemic Inflammation in Alzheimer's Disease. ACS Chemical Neuroscience 10, 3340-3342 (2019). <u>https://doi.org:10.1021/acschemneuro.9b00333</u>
- 106 Frasca, D., Blomberg, B. B. & Paganelli, R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Front Immunol* **8**, 1745 (2017). <u>https://doi.org:10.3389/fimmu.2017.01745</u>
- 107 Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B. & Schwarz, M. J. The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci* 9, 372 (2015). <u>https://doi.org:10.3389/fnins.2015.00372</u>
- 108 Karageorgiou, V., Milas, G. P. & Michopoulos, I. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research* 206, 4-12 (2019). <u>https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.12.017</u>
- 109 Gahr, M. & Zeidler, C. in *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis* (eds Georg F. Hoffmann, Michael J. Lentze, Jürgen Spranger, & Fred Zepp) 1-12 (Springer Berlin Heidelberg, 2015).
- 110 Papavlassopoulos, M. *Untersuchungen zum LPS-Rezeptorkomplex*. (Verlag nicht ermittelbar, 2006).
- 111 Okamoto, T. *et al.* Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **286**, L198-L209 (2004). <u>https://doi.org:10.1152/ajplung.00136.2003</u>
- Kleinman, H. K. *et al.* Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318 (1986). <u>https://doi.org:10.1021/bi00350a005</u>
- Hu, N. *et al.* Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One* 9, e99671 (2014). <u>https://doi.org:10.1371/journal.pone.0099671</u>
- 114 Zhou, G. *et al.* CD177+ neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* **67**, 1052-1063 (2018). <u>https://doi.org:10.1136/gutjnl-2016-313535</u>
- Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2873-2896 (2009). <u>https://doi.org:10.1007/s00018-009-0053-z</u>
- Freire, M. G., Dias, A. M. A., Coelho, M. A. Z., Coutinho, J. A. P. & Marrucho, I. M. Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 286, 224-232 (2005). https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.12.036
- 117 Taylor, P. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **75**, 107-163 (1998). <u>https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9</u>

- 118 Johnson, S. M., Bangham, A. D., Hill, M. W. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 223, 820-826 (1971). https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90273-2
- 119 Köhler, K. Simultanes emulgieren und mischen. (Logos Verlag Berlin GmbH, 2010).
- 120 Becker, K. Untersuchung der Gewebeverteilung und -halbwertszeit sowie der zellulären Aufnahme von 19F-Tracern unter entzündlichen und nicht-entzündlichen Bedingungen, Universitätsbibliothek, (2020).
- 121 Eftink, M. R. & Ghiron, C. A. Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* **114**, 199-227 (1981). <u>https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90474-7</u>
- 122 Lakowicz, J. R. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (ed Joseph R. Lakowicz) 257-301 (Springer US, 1983).
- 123 Wimmer, C., Arnold, T. & Großmann, K. Untersuchungen zur Fluoreszenz von Lactat bei Raumtemperatur und tiefen Temperaturen. *Chemie Ingenieur Technik* **81**, 501-504 (2009). https://doi.org/10.1002/cite.200800169
- 124 Almgren, M., Edwards, K. & Karlsson, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **174**, 3-21 (2000). https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00516-1
- 125 Robson, A.-L. *et al.* Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology. *Frontiers in Pharmacology* **9** (2018). https://doi.org:10.3389/fphar.2018.00080
- Baxa, U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol* 1682, 73-88 (2018). <u>https://doi.org:10.1007/978-1-4939-7352-1\_8</u>
- 127 Akazawa, K. *et al.* Perfluorocarbon-Based 19F MRI Nanoprobes for In Vivo Multicolor Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 16742-16747 (2018). https://doi.org/10.1002/anie.201810363
- 128 Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 769-784 (2015). <u>https://doi.org:10.1007/s00432-014-1767-3</u>
- 129 Bahmani, B., Vohra, I., Kamaly, N. & Abdi, R. Active targeted delivery of immune therapeutics to lymph nodes. *Curr Opin Organ Transplant* 23, 8-14 (2018). https://doi.org:10.1097/MOT.00000000000495
- 130 Mahato, R. Nanoemulsion as Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapeutics. Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology 3, 83-97 (2017). https://doi.org:10.1166/jpsp.2017.1082
- 131 Hertz, B. & Schuller, K. Saul Hertz, MD (1905-1950): A Pioneer in the Use of Radioactive Iodine. *Endocrine Practice* 16, 713-715 (2010). <u>https://doi.org:10.4158/ep10065.Co</u>
- 132 Baum, R. P., Kulkarni, H. R. & Albers, P. Theranostik. *Der Onkologe* **23**, 597-608 (2017). <u>https://doi.org:10.1007/s00761-017-0246-2</u>
- 133 Maric, I., Herrmann, K., Fendler, W. P., Rischpler, C. & Sandach, P. Bildgebung in der Onkologie. *Forum* 35, 309-315 (2020). <u>https://doi.org:10.1007/s12312-020-00810-2</u>
- Nienhaus, F. *et al.* Phagocytosis of a PFOB-Nanoemulsion for (19)F Magnetic Resonance Imaging: First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24, 2058 (2019). https://doi.org:10.3390/molecules24112058

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs).	9
Abb. 2: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse muriner Blutzellen.	23
Abb. 3: Graphische Darstellung der größenvariablen PFCs.	29
Abb. 4: Graphische Darstellung eines Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikels (PFC) mit gekoppeltem Per	otid an
der Oberfläche.	31
Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur in vivo Bildgebung.	37
Abb. 6: Bindung eines Antikörpers gegen CD177 an murine Immunzellen.	40
Abb. 7: CD177-Expression auf Neutrophilen Granulozyten aus dem Blut, dem Knochenmark und dem Ma	trigel
gesunder Mäuse und Mäusen mit einem Matrigel/LPS-Gel.	41
Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Bindung von <sup>mNGP</sup> PFCs und <sup>mCon</sup> PFCs an murine Immunzellen.	43
Abb. 9: Einfluss der Konzentration von mNGP auf die Bindung der mNGPPFCs an Neutrophile Granulozyte	n nach
Kopplung der Peptide an die PFCs in drei Mengen.	44
Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Bindung von mNGPPFCs an murine Neutrophile Granulozyten in gesunden	und
Matrigel/LPS-stimulierten Mäusen.	45
Abb. 11: Bindung von freiem mNGP an murine Immunzellen.	46
Abb. 12: Fluoreszenzmessungen von mNGP und mCon.	47
Abb. 13: Bindung von mNGP an Neutrophile Granulozyten über einen 8-Arm-PEG-Maleimid-Anker.	48
Abb. 14: DLS-Messungen von PFCs mit unterschiedlichem Lipidgehalt.	49
Abb. 15: Fluoreszenzmessungen von <sup>150nm</sup> PFCs, <sup>350nm</sup> PFCs und <sup>500nm</sup> PFCs.	50
Abb. 16: Aufnahme von <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs in murinen Immunzellen.	52
Abb. 17: Ex vivo Bindung von 150nm - 500nm PFCs in nativen und in mit einem Matrigel/LPS-Gel stimulierten	
Mäusen.	54
Abb. 18: Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs an Neutrophile Granulozyten aus einem Matrigel/LPS-Gel.	55
Abb. 19: <sup>19</sup> F-Signal von Neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark gesunder und LPS-stimulierte	r
Mäuse nach ex vivo Inkubation mit <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs.	56
Abb. 20: In vivo Bindung von <sup>150nm - 500nm</sup> PFCs an Neutrophile Granulozyten von nativen und mit einem	
Matrigel/LPS-Gel stimulierten Mäusen.	58
Abb. 21: Kombinierte <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-Bildgebung von LPS-stimulierten Mäusen nach Injektion von <sup>350nm</sup> PFCs.	60
Abb. 22: Schematische Darstellung des Zerfalls von Emulsionen bei Lagerung.	71

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Typenbezeichnung	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien mit Herstellernennung	15
Tabelle 3: Puffersysteme, Medien und Chemikalien mit Herstellernennung	15
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	17
Tabelle 5: Verwendete Peptide	17
Tabelle 6: Immunzellen und ihre Oberflächenantigene	25
Tabelle 7: Komponenten zur Herstellung einer Perfluorkarbon-Nanoemulsion	28
Tabelle 8: PFCs verschiedener Größen und die Konzentrationen ihrer Komponenten	29

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Schrader für die freundliche Erlaubnis bedanken, meine Dissertation in seinem Institut für Molekulare Kardiologie anzufertigen.

Ein besonderer Dank gilt zudem Prof. Dr. Ulrich Flögel und insbesondere PD Dr. Sebastian Temme, welche mir überhaupt die unfassbare Möglichkeit geboten haben, bei ihnen zu promovieren. Ohne Sebastian wäre ich nicht in diesem großartigen Labor gelandet und ohne ihn würde ich immer noch nicht abgegeben haben. Ich bedanke mich für die unfassbar gute und ständige Betreuung. Herrn PD Dr. Florian Bönner möchte ich ebenso gerne für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt vor allem auch Dr. Pascal Bouvain, der mich seit dem ersten Tag im Labor gelehrt und unterstützt hat, meine endlosen nervenaufraubenden Fragen stets mit Geduld und Humor beantwortet hat und zu jedem Zeitpunkt für mich da war, wenn ich mal wieder Hilfe gebraucht habe.

Ich bedanke mich zudem bei Dr. Christian Hundhausen für die überaus freundliche Möglichkeit zu jedem Zeitpunkt das Durchflusszytometer im Institut für Pharmakologie genutzt haben zu dürfen.

Weiter möchte ich mich auch beim (ehemaligen) Institutsteam für die Unterstützung und die Unterhaltung im Labor bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Tamara, Vera, Ria (der Tierversuchskurs mit dir war ein Highlight!), Asli, Patricia, David, Christoph und Bodo. Ohne jeden von Euch wäre die Laborarbeit nicht halb so aufregend gewesen.

Mein größter Dank gilt meinen engsten Freunden und vor allem meiner Familie für den starken Rückhalt. Danke Mama, Papa, Sham, Sharo und Kani für alles. Danke auch an meinen liebevollen Ehemann Brwa, der mich in den letzten Zügen der Arbeit täglich mit der schönsten Geduld und Zuversicht ertragen, motiviert und unterstützt hat, wenn ich mal wieder am Schreibtisch sitzen musste. Alhamdulillah, es ist nun vollbracht.