

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
In der Arbeitsgruppe für Experimentelle kardiovaskuläre Bildgebung
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

**Aktives Targeting von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen zur
Ansteuerung humaner CD4⁽⁺⁾ T-Zellen *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Georgina Chiarella Wittke

2025

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Sebastian Temme

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Flögel

Für meine Geschwister.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Atto
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Av.	Avidin
Biot.	Biotin
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CD	Cluster of Differentiation
Cfl.	Carboxyfluorescein
Chol-PEG	Cholesterol-Polyethylenglykol ₂₀₀₀
CPP	Cell Penetrating Peptide
CT	Computertomographie
Cy5.5	Cyanine-5.5
DAMP	damage-associated molecular pattern
DAPI	48,6-Diamidin-2- phenylindol, Dihydrochlorid
DiBlock	1-(Perfluor-n-hexyl)decan
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Enhanced Permeability and Retention
Et al.	Et alteri
F	Fluor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDA	US Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
G	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Wasserstoff
IFN γ	Interferon-gamma
IL-	Interleukin
i.v.	Intravenös
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität / Mittleres Fluoreszenzsignal
Mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mol%	Molprozent
MPS	Mononukleäres-phagozytäres System
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
mV	Millivolt

MYHCA	myosin heavy chain α
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Probenanzahl
Nm	Nanometer
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
NP	Nanopartikel
O	Sauerstoff
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, dt. periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFCs	Perfluorkarbon-Nanopartikel
PFCE	Perfluor-15-Kronen-5-Ether
PFCH	Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PRR	Pattern Recognition Receptor
RES	Retikuloendotheliales System
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SMVT	Sodium Dependent Multivitamin Transporter, dt. Natriumabhängiger Multivitamintransporter
SNR	Signal to noise ratio; Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomografie
SPIT	Sterol-basierte-Post-Insertions-Technik
Tab.	Tabelle
TAT	transactivator of transcription
TGF-β	transforming growth factor β
x g	Relative Zentrifugalkraft
z. B.	Zum Beispiel

Zusammenfassung

Das Immunsystem ist die wesentliche Barriere unseres Organismus zur Bekämpfung von Pathogenen. Zahlreiche Zellgruppen agieren in seinem Rahmen autonom durch ihre spezifischen Funktionen, wobei die interzellulären Interaktionen ebenso relevant für den Erfolg der Immunabwehrfunktionen sind. Insbesondere die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort und der Vermeidung von Autoimmunreaktionen, da ihre Fähigkeit zum Klassentausch entscheidend für die Anpassung an unterschiedliche Pathogene und Umgebungsbedingungen ist. Die Visualisierung von T-Zellen, insbesondere der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, gewinnt daher im Kontext von Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen eine große klinische Bedeutung. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit liegt sowohl in der Optimierung der Visualisierung als auch in der Verbesserung der Markierungsspezifität von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen in der ¹⁹F-Magnetresonanztomographie (¹⁹F-MRT). Aufgrund ihrer Nichtinvasivität ist die MRT ein beliebtes bildgebendes Verfahren für die medizinische Diagnostik. Der Einsatz nichttoxischer fluorbasierter Kontrastmittel, in diesem Fall sind dies Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs), soll diese in ihrer Genauigkeit und Effizienz ergänzen. Die Arbeit setzt sich aus mehreren Schritten zusammen, die sich auf die Untersuchung des passiven und aktiven Aufnahmeverhaltens von PFCs durch die Zielzellen konzentrieren. Im ersten Schritt wurde hierzu die passive PFC-Aufnahme durch Leukozyten untersucht. Dabei wurde geprüft, wie die Zellen die PFCs ohne zusätzliche Modifikationen aufnehmen. Auch der Einfluss einer PEGylierung der Partikel auf die Partikelinkorporation wurde analysiert. So konnte mit einer PEGylierung der Partikel von 20 mol% die Aufnahme durch phagozytisch aktive Zellen erfolgreich gehemmt werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde zudem auf Grundlage einer Biotin-Avidin-Kopplungsstrategie ein Targeting-System zur Markierung von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit biotinylierten PFCs etabliert. Einer der hierfür wichtigsten Schritte stellte die Biotinylierung der Nanopartikel dar, welche mittels anschließender MR-Bildgebung bestätigt wurde. Auch die Bindung biotinylierter Anti-CD4-Antikörper an die T-Zell-Oberfläche erwies sich als erfolgreich. Im aktiven Targeting der PFCs ließ sich eine präferierte Partikelinkorporation biotinylierter PFCs durch CD4⁽⁺⁾ T-Zellen darstellen und die Biotin-Avidin-Kopplung zwischen Zellen und PFCs bestätigen.

Insgesamt liefert diese Arbeit somit wichtige Erkenntnisse zur Optimierung bildgebender Verfahren und zur zielgerichteten Darstellung spezifischer Zellpopulationen. Für zukünftige Projekte wird eine Überarbeitung der Targeting-Strategie empfohlen, um eine noch präzisere und spezifischere Bindung der Partikel an CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zu erreichen. Die gewonnenen Erkenntnisse können langfristig zur Verbesserung diagnostischer und therapeutischer Ansätze beitragen, indem sie eine genauere Visualisierung von Immunzellen ermöglichen.

Summary

The immune system is the essential barrier of our organism to combat pathogens. Numerous cell groups act autonomously within its framework through their specific functions, whereby the intercellular interactions are just as relevant for the success of immune defence functions. CD4⁽⁺⁾ T cells in particular play a central role in the regulation of the immune response and the avoidance of autoimmune reactions, as their ability to switch classes is decisive for the adaptation to different pathogens and environmental conditions. Therefore, the visualisation of T cells, especially CD4⁽⁺⁾ T cells, is of great clinical importance in the context of inflammatory processes and autoimmune diseases. The main aim of the present work is to optimise the visualisation and to improve the labelling specificity of CD4⁽⁺⁾ T cells in ¹⁹F magnetic resonance imaging (¹⁹F MRI). Due to its non-invasiveness, MRI is a popular imaging technique for medical diagnostics. The use of non-toxic fluorine-based contrast agents, in this case perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs), is intended to complement it in terms of accuracy and efficiency. The work consists of several steps which focus on the investigation of the passive and active uptake behaviour of PFCs by the target cells. In the first step, passive PFC uptake by leukocytes was investigated. This involves examining how the cells take up the PFCs without additional modifications. The influence of PEGylation of the particles on particle incorporation by the leukocytes was also analysed. Particle-PEGylation of 20 mol% suppressed the uptake by phagocytically active cells successfully. Within this work, a targeting system for labelling CD4⁽⁺⁾ T cells with biotinylated PFCs was also established using a biotin-avidin coupling strategy. The biotinylation of the nanoparticles was one of the most important steps in this process, which was confirmed by subsequent MR imaging. The binding of biotinylated anti-CD4 antibodies to the T-cell surface also proved to be successful. In the active targeting of PFCs, a preferential particle incorporation of biotinylated PFCs by CD4⁽⁺⁾ T cells was demonstrated, thus confirming the biotin-avidin interaction between cells and PFCs.

In summary, this work provides important insights into the optimisation of imaging techniques and the targeted imaging of specific cell populations. For future projects, a revision of the targeting strategy is recommended in order to achieve even more precise and specific binding of the particles to CD4⁽⁺⁾ T cells. In the long term, the knowledge gained can contribute to the improvement of diagnostic and therapeutic approaches by enabling more precise visualisation of immune cells.

Inhalt

Für meine Geschwister	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Summary.....	IV
Inhalt.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Immunabwehr.....	1
1.1.1. Die angeborene Immunantwort.....	1
1.2. Lymphozyten – Die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort.....	2
1.2.1. Die zentrale Rolle der CD4 ⁽⁺⁾ T-Zellen für die Immunabwehr	3
1.2.2. Die Rolle der CD4 ⁽⁺⁾ T-Zellen im Myokardinfarkt	4
1.3. Bildgebung von T-Zellen.....	5
1.4. MRT und ¹⁹ F-MRT	7
1.4.1. PFCs in der MR-Bildgebung.....	8
1.5. Drug Targeting.....	8
1.5.1. Passives Targeting	9
1.5.2. Aktives Targeting.....	9
1.5.3. Nutzung der Biotin-Avidin-Interaktion im aktiven Targeting	10
1.6. Möglichkeiten der Funktionalisierung von PFCs	11
1.6.1. PEGylierung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen.....	11
1.7. Zielsetzung.....	12
2. Material.....	13
2.1. Geräte und Apparaturen	13
2.2. Verbrauchsmaterial.....	14
2.3. Chemikalien.....	14
2.4. Puffer und Medien	15
2.5. Antikörper	16
2.6. Software	16
3. Methoden.....	17
3.1. Herstellung und Funktionalisierung von PFCs.....	17
3.1.1. Herstellung fluoreszenzmarkierter PFCs mittels Hochdruckhomogenisation	18
3.1.2. Funktionalisierung der PFCs mit Biotin	19
3.1.3. PEGylierung der PFCs mittels Sterol-basierter-Post-Insertions-Technik (SPIT)	20

3.1.4.	Funktionalisierung von ^{Biotin} .PFCs mit NeutrAvidin	20
3.2.	Charakterisierung von PFCs.....	21
3.2.1.	Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)	21
3.2.2.	Charakterisierung mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)	22
3.2.3.	Messung der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzspektroskopie	23
3.2.4.	Charakterisierung mittels ¹⁹ F-MRT	24
3.3.	Validierung der PFC-Biotinylierung	24
3.4.	Durchflusszytometrische Analyse der zellulären PFC-Aufnahme	25
3.4.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	25
3.4.2.	Ethikvotum	26
3.4.3.	Isolation von Leukozyten aus humanem Blut	26
3.4.4.	Targeting von Leukozyten mit PFCs.....	26
3.4.5.	Targeting von PEGylierten PFCs.....	27
3.4.6.	Funktionalitätstest biotinylierter Antikörper	27
3.4.7.	Aktives Targeting von ^{Biotin} .PFCs und ^{Av.Biotin} .PFCs	28
4.	Ergebnisteil	29
4.1.	Zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten PFCs	29
4.1.1.	Herstellung und Charakterisierung	29
4.1.2.	Zelluläre Aufnahme von PFCs durch humane Immunzellen	32
4.2.	Zelluläre Aufnahme von PEGylierten PFCs.....	37
4.2.1.	Herstellung und Charakterisierung von PEG- ^{A488} PFCs und PEG- ^{A647} PFCE-PFCs 37	
4.2.2.	Analyse der zellulären Aufnahme von PEG-PFCs durch humane Immunzellen 40	
4.2.3.	Einfluss der PEGylierung von PFCs auf die Zellviabilität	43
4.3.	Funktionalitätstest biotinylierter CD4-Antikörper.....	44
4.4.	Die Biotin-Avidin-Interaktion für die aktive Ansteuerung von T-Zellen.....	45
4.4.1.	Herstellung und Charakterisierung von biotinylierten ^{Cfl} .PFCs und ^{A488} .PFCs .	45
4.4.2.	Passive Aufnahme biotinylierter ^{A488} .PFCs	53
4.4.3.	Aktives Targeting von ^{Av.Biotin} .PFCs	54
4.4.4.	Analyse der zellulären Aufnahme biotinylierter PFCs.....	57
5.	Diskussion	60
5.1.	Nanopartikel als Kontrastmittelträger in der ¹⁹ F-Bildgebung	61
5.2.	Einfluss der PFC-Eigenschaften auf die passive zelluläre Aufnahme.....	64
5.3.	PEGylierung von PFCs verringert die zelluläre Aufnahme.....	66
5.4.	Aktives Targeting von CD4 ⁽⁺⁾ T-Zellen mittels Avidin-Biotin-Kopplung	69
5.5.	Schlussfolgerungen.....	74
5.6.	Optimierung des Targetings und Ausblick.....	74

6. Literaturverzeichnis	78
7. Danksagung	88

1. Einleitung

1.1. Die Immunabwehr

Der Mensch ist konstant Krankheitserregern ausgesetzt, die durch Inhalation, oral oder über die Haut und Schleimhäute aufgenommen werden. Dabei ist die allgemeine Immunantwort zur Abwehr von Infektionen und zur Aufrechterhaltung der Gesundheit und des Wohlbefindens eines Individuums von entscheidender Bedeutung. Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, welches mithilfe des Zusammenspiels verschiedener Zellen, Signalstoffe und Moleküle den Wirt vor Pathogenen schützt. Umgesetzt wird dies durch die Regulation von Inflammation und Apoptose, die Erkennung von verletztem und erkranktem Gewebe, die Induzierung von Reparaturprozessen sowie die direkte Abtötung von Erregern. Vereinfacht kann man bei Wirbeltieren, also auch bei Menschen, das angeborene von dem adaptiven Immunsystem unterscheiden, wobei die Grenzen aufgrund reger Interaktionen mittlerweile als fließend dargestellt werden.¹ Eine präzise Regulation des Immunsystems ist erforderlich, um Überreaktionen zu verhindern und eine angemessene Reaktion auf Erreger zu gewährleisten.

1.1.1. Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort, auch *Innate Immunity* genannt, bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger und legt den Grundstein für die Entwicklung einer spezifischen, erworbenen Immunität. Bei einer Infektion werden zunächst pathogene Organismen durch angeborene Abwehrmechanismen erkannt. Dazu gehören Hautbarrieren, Schleimhäute und phagozytierende Zellen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen die charakteristischen Strukturen der Erreger, bekannt als *Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)*, anhand spezieller Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors, PRRs*).² Dadurch liefert sie eine sofortige antigenunabhängige Antwort auf Pathogene. Die Zellen verfügen zudem über die Fähigkeit, die adaptive Immunantwort einzuleiten, indem sie Antigene präsentieren und dadurch Lymphozyten des adaptiven Immunsystems aktivieren. Makrophagen sind die ersten Zellen, die auf die eindringenden Erreger bzw. Gewebeschäden reagieren. Sie bewirken die Ausschüttung und Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen in das umliegende Gewebe und den Blutkreislauf und differenzieren sich je nach lokalem Entzündungsmilieu in mehrere verschiedene Makrophagen-Subtypen.^{3,4} In der Folgeaktion werden weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen rekrutiert und stimuliert, welche reaktive Sauerstoffspezies und andere antimikrobielle Moleküle freisetzen. Zu den antimikrobiellen Substanzen gehören unter

anderem Lysozyme, welche die Zellwand von Bakterien angreifen, sowie Defensine, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Die Phagozytose ist eine weitere bedeutungsvolle Fähigkeit dieser Zellen, denn sie ermöglicht die Aufnahme und Verdauung von anderen Zellen und Zellbestandteilen. Zudem wird das Komplementsystem, welches sich aus Plasmaproteinen zusammensetzt, aktiviert, um Krankheitserreger zu markieren und zu bekämpfen. Es unterstützt die Phagozytose, verstärkt die Entzündungsreaktion und wirkt direkt auf Erreger ein.⁵

Zwar ist die angeborene Immunantwort unerlässlich für die direkte und effektive Bekämpfung von Erregern, jedoch ist sie unspezifischer als ihr Pendant, die adaptive Immunantwort. Deren Wirkung beruht auf antigenspezifischen Zellen und tritt zwar erst nach Stunden bis Tagen nach Exposition ein, ist dafür aber weitaus zielgerichteter und wirkungsstärker als die *Innate Immunity*.⁶

1.2. Lymphozyten – Die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort

Im Zentrum der adaptiven Immunantwort stehen die Lymphozyten, die sich in T- und B-Zellen untergliedern lassen und auf externe Stimulation angewiesen sind.⁷ Inaktive B-Zellen zirkulieren im Blut und den sekundären lymphatischen Organen bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Zu ihren Hauptaufgaben als antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells, APCs*) gehören die Erkennung und Aufnahme des Antigens und dessen Präsentation auf ihrer Zelloberfläche. Nach Aktivierung durch Interaktion mit T-Zellen können die B-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren, proliferieren und spezifische Antikörper gegen das Antigen produzieren.⁸ Diese Prozesse ermöglichen die gezielte Bekämpfung des Erregers. Die Aufgaben der T-Lymphozyten liegen im Wesentlichen in der Auslösung und Aufrechterhaltung von Immunreaktionen, der Homöostase und dem Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses. Gedächtniszellen sind bei der schnellen und effektiven Reaktion des Immunsystems auf eine erneute Exposition bekannter Pathogene von hoher Relevanz. Sowohl T- als auch B-Zellen können Gedächtniszellen bilden, welche sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, spezifische Antigene aus der Umwelt, von Krankheitserregern und von entarteten Zellen zu erkennen. Die Erkennung erfolgt durch die Bindung von Antigenen an Rezeptoren auf der Oberfläche der T- und B-Zellen. B-Zellen werden im peripheren Gewebe aktiviert und können dort direkt zu Gedächtniszellen differenzieren. T-Zell-Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark stammen, wandern in den Thymus, ein lymphatisches Organ, wo sie einem Auswahlprozess unterzogen werden und in reife T-Zellen differenzieren. Ein Teil dieser reifen T-Zellen wird zu naiven T-Zellen, die bereit sind, auf spezifische Antigene zu reagieren und Gedächtniszellen zu bilden.⁹ Im Falle der T-Zellen werden Antigene von spezialisierten APCs in Form

von Peptid-MHC-Klasse-I- und II-Komplexen präsentiert. Diese Komplexe ermöglichen es den T-Zellen, die präsentierten Antigene zu erkennen und daraufhin eine Immunantwort zu initiieren. Die T-Zell-Gedächtniszellen behalten die Fähigkeit, das spezifische Antigen, auf das sie bei der ersten Exposition gestoßen sind, zu erkennen. Dadurch können sie bei einer erneuten Exposition schnell aktiviert werden und eine beschleunigte und stärkere Immunantwort auslösen.

Während die Entwicklung von B-Zellen *in vitro* mit Stromazellen aus dem Knochenmark reproduzierbar ist, ist dies für T-Zellen nicht der Fall: Die erfolgreiche und ordnungsgemäße T-Zell-Entwicklung scheint demnach thymusabhängig, geleitet von einzigartigen Signalen thymischer Stroma- oder Epithelzellen, zu sein.¹⁰ Grob lassen sich CD4⁽⁺⁾ T-Helferzellen, welche andere Immunzellen bei der Elimination der Pathogene unterstützen, und zytotoxische CD8⁽⁺⁾ T-Zellen, welche der direkten Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen dienen, unterscheiden. Nach Bindung des Antigens über den T-Zell-Rezeptor werden die T-Zellen stimuliert und eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, welche weitere Prozesse wie die Zytokinproduktion oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Gang setzt. Durch ihre Fähigkeit B-Zellen bei der Produktion von Antikörpern zu unterstützen, Makrophagen zu verstärkter Aktivität zu verhelfen und Granulozyten an Infektions- und Entzündungsherde zu rekrutieren, steuern sie eine ganze Reihe an Immunreaktionen.¹¹ Sie werden zudem als Hauptverursacher vieler Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten angesehen.

1.2.1. Die zentrale Rolle der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen für die Immunabwehr

CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, sind durch ihr Oberflächenprotein CD4 (*CD = Cluster of Differentiation*) gekennzeichnet. Im Jahr 1986 konnten Timothy Mossman und Robert Coffman in ihrer Pionierarbeit erstmals zeigen, dass die CD4-T-Zelllinien basierend auf ihrer Zytokinproduktion in zwei Gruppen unterteilt werden können: In IFN-produzierende und IL-4-produzierende/ Typ1- (Th1) und Typ2 T-Helferzellen (Th2).^{12,13} Seither wurden weitere Untergruppen anhand charakteristischer Zytokinprofile identifiziert, darunter Typ17- (Th17) und Typ9 (Th9) T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen (Treg) und folliculäre T-Helferzellen.¹⁴ Daneben werden sie auch mithilfe der Analyse von extrazellulären Proteinen, intrazellulären Transkriptionsfaktoren und Effektormolekülen typisiert.^{15,16} Die Subpopulationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Immun- und Effektorantwort der T-Zellen, da sie je nach Phänotyp und Zytokinrepertoire unterschiedliche Funktionen aufweisen.

Was die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen besonders interessant macht, ist ihre hohe Plastizität, die sie in Abhängigkeit vom Krankheitsprofil, dem umgebenden Zytokin- und Chemokinmilieu und reguliert durch

epigenetische Prozesse zur Differenzierung in andere CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Subtypen befähigt.¹⁷⁻¹⁹ So können Treg-Zellen durch Verlust des Transkriptionsfaktors FOXP3 (Forkhead-Box-Protein P3) zu Tfh-Zellen²⁰ oder unter IL6- und IL-21-Stimulation zu IL-17 produzierenden Zellen reifen.²¹ Diese Eigenschaft ist elementar für die Balance von protektiven und destruktiven Mechanismen in Entzündungsherden und ermöglicht nicht nur eine hohe Anpassungsfähigkeit, sondern auch eine hochadäquate Immunantwort. Dennoch birgt das Potenzial zur Plastizität die Gefahr einer Fehlregulation mit vorrangig pathologischen Auswirkungen auf den Organismus. Gerade bei den Treg-Zellen ist dies mit einem erhöhten Vorkommen von Autoimmunkrankheiten, Allergien und nicht zuletzt Transplantatabstoßungen assoziiert.¹⁴ Abbildung 1 stellt einige Möglichkeiten der Umwandlung und Plastizität der Subtypen dar.

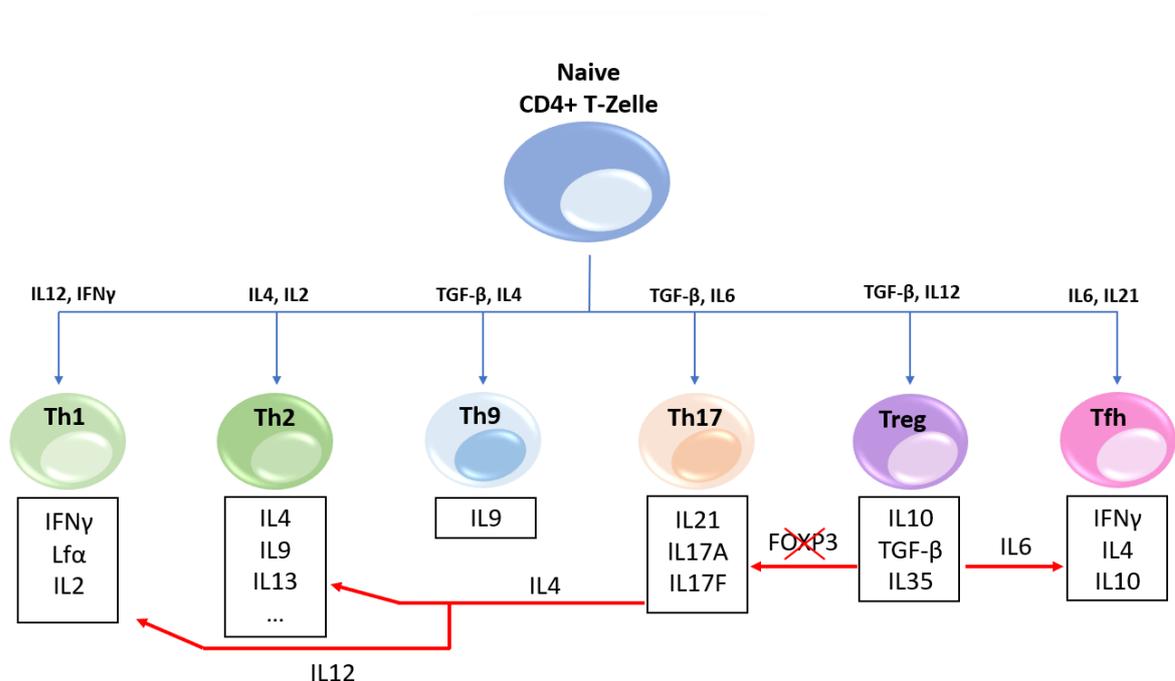


Abbildung 1: Differenzierung naiver CD4⁽⁺⁾ T-Zellen in verschiedene Subtypen. Dargestellt ist der Einfluss bestimmter Zytokin-Milieus auf die Differenzierung der Zellen durch die blauen Pfeile. Die Plastizität der T-Zell-Subtypen unter dem Einfluss eines bestimmten Zytokins oder durch Verlust der Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird durch die roten Pfeile dargestellt. Die für die Subgruppe typisch produzierten Zytokine sind eingerahmt. Quelle: Eigene Darstellung

1.2.2. Die Rolle der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im Myokardinfarkt

Der Herzinfarkt stellt als schwerwiegende Folge der koronaren Herzkrankheit eine global führende Ursache für die zunehmende Mortalität und Morbidität dar.²² Nicht nur die Ischämie an sich, sondern auch Reperforationsmaßnahmen führen neben einer Gewebsschädigung zur Freisetzung von Mediatoren wie DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), Zytokinen und Chemokinen,

welche eine Entzündungsreaktion auslösen.²³ Diese Reaktion führt wiederum zur Einwanderung von Immunzellen wie Myelozyten und Lymphozyten in das betroffene Gewebe. Unter diesen scheinen die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im Heilungsprozess von hoher Relevanz zu sein, da sie in der Lage sind, mit Makrophagen und kardialen Fibroblasten zu interagieren.^{24,25} Hierbei stehen die pro-inflammatorischen destruktiven Mechanismen den regenerativen anti-inflammatorischen gegenüber. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits einige Signalwege, über welche T-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt werden, in ihrer Multidimensionalität und Komplexität darstellen. So sind die regulatorischen T-Zellen, die durch den Transkriptionsfaktor FOXP3+ identifiziert werden, ausschlaggebend für die Selbsttoleranz des Immunsystems.²⁶ Indem sie die Immunreaktivität begrenzen, wird die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen gehemmt und eine überschüssige Immunantwort verhindert.²⁷ Sie schaffen ein anti-inflammatorisches Milieu im Infarktgebiet und induzieren darüber hinaus die Differenzierung von M1- zu M2-Makrophagen, welche wegen ihrer fibroproliferativen und Angiogenese-fördernden Funktionen die Gewebeheilung und Narbenbildung unterstützen.^{24,28} Dabei zeigen die T-Zell-Subtypen selbst auch fibroproliferative Eigenschaften.²⁵ Die Arbeitsgruppe Rieckmann grenzt sogar für das Myokard charakteristische T-Zellen ab, die primär durch das kardiale Antigen *MYHCA* (*myosin heavy chain α*) aktiviert werden und einen kardioprotektiven Phänotyp ausbilden.²⁹ Außerdem wird ein spezielles Migrationsverhalten der *MYHCA*-T-Zellen mit selektiver Akkumulierung im Myokard und mediastinalen Lymphknoten beschrieben. Nicht zu vernachlässigen sind dennoch überschießende Kollagenbildung und Aktivität pro-inflammatorisch wirkender T-Zellen, die im Kontext eines Myokardinfarkts auftreten. Man spricht dabei von „*adverse cardiac remodeling*“, also einem ungünstigen Gewebeumbau des Myokards.^{14,30} Eine Veränderung der Herzarchitektur kann das Risiko für die Manifestation einer Herzinsuffizienz deutlich erhöhen.³¹

1.3. Bildung von T-Zellen

Die Bildung von T-Zellen trägt wesentlich zum Verständnis ihrer Funktionen in der Immunantwort im Rahmen verschiedener Erkrankungen bei. Sie ermöglicht die Visualisierung und Analyse der T-Zell-Interaktionen in Geweben und Organen, was die Entwicklung neuer Therapien und Impfstoffe, die T-Zellen anvisieren, vorantreibt.

Verschiedene bildgebende Verfahren kommen bei der Untersuchung von T-Zellen in Frage. Eine gängige Methode ist die Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Zellen mittels spezifischer Antikörper oder Farbstoffe markiert werden. Diese Markierungen ermöglichen es, die Zellen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen und ihre Lokalisation in Geweben oder Organen zu

analysieren. Durch die Kombination von mehreren Markierungen kann auch die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen oder Zellaktivitäten innerhalb der T-Zellen untersucht werden.³² Die Anwendung spezifischer Fluorochrome, die selektiv an bestimmte Proteine oder Moleküle in den T-Zellen binden, erlaubt die Visualisierung komplexer Interaktionen und räumlicher Verteilungsmuster von Markern in den Zellen.³³ Die Durchflusszytometrie hingegen ermöglicht eine solche Analyse auf Einzelzellenebene. Auch hier werden Fluorochrome verwendet: Diese binden an spezifische Oberflächenmoleküle auf T-Zellen, sodass diese Marker auf den Zellen quantifiziert und verschiedene T-Zell-Subpopulationen unterschieden werden können. Zusätzlich erlaubt es die Untersuchung von intrazellulären Molekülen, zellulären Signalwegen oder Zytokinen, um die Funktion und Aktivierung von T-Zellen detailliert zu charakterisieren.³⁴ Die Kombination der Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie eröffnet ein breites Spektrum an analytischen Möglichkeiten für die T-Zellforschung, einschließlich der Untersuchung von Antigenpräsentation, Zellmigration und immunologischer Reaktionen.

Eine weitere Technik ist die Positronenemissionstomographie (PET), bei welcher radioaktiv markierte Moleküle verwendet werden, um spezifische Zielstrukturen im Körper zu erfassen. Durch die Markierung von T-Zellen oder von T-Zell-Antikörpern mit radioaktiven Substanzen können ihre Verteilung und Migration im Körper in Echtzeit verfolgt werden.^{35,36} Dies ermöglicht die Untersuchung von Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen oder Krebserkrankungen³⁷, bei welchen T-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus kommen auch bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Einzelphotonenemissionstomographie (*Single-Photon-Emissions-Computertomografie*, SPECT) zum Einsatz, um T-Zellen darzustellen und ihre Aktivitäten zu untersuchen.³⁸ Diese nichtinvasiven Verfahren bieten detaillierte Informationen über die räumliche Verteilung und funktionellen Eigenschaften von T-Zellen im Körper.

Die beschriebenen Verfahren erfordern meist eine Isolation und Markierung der T-Zellen vor Durchführung der Bildgebung, wodurch die natürliche Migration der Zellen zum Entzündungsherd manipuliert wird. Weiterhin ist nicht bekannt, inwiefern sich die Modifizierung der Zellen auf ihre Eigenschaften auswirkt, da unter anderem toxische und radioaktive Stoffe verwendet werden. Es ist wünschenswert, bildgebende Verfahren einzusetzen, die nichttoxische Substanzen zur *in vivo*-Markierung der T-Zellen verwenden, sodass ihre Funktionen und Struktur so wenig wie möglich beeinflusst werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll die T-Zell-Markierung mithilfe von Perfluorkarbon-basierten Nanoemulsionen untersucht werden, ohne dass eine vorherige Trennung von anderen Zellgruppen erforderlich ist, um sie in der MRT darstellen zu können.

1.4. MRT und ¹⁹F-MRT

Die Magnetresonanztomographie ist ein nichtinvasives Schnittbildverfahren, welches eine Darstellung von Weichteilstrukturen und Nervengewebe in verschiedenen Raumebenen (transversal, koronar und sagittal) erlaubt. Vor allem in der klinischen Diagnostik ist es ein nicht mehr wegzudenkendes Hilfsmittel. Anders als bei anderen Schnittbildverfahren kommen dabei keine ionisierende Strahlung, sondern ein starkes Magnetfeld und Hochfrequenzimpulse zum Einsatz.³⁹

Die bei der MR-Bildgebung detektierten Signale werden von Atomkernen abgeleitet, die wie beispielsweise Wasserstoffatome (¹H) endogen im Organismus vorhanden sind oder in Form eines Kontrastmittels in diesen eingebracht werden. Die Protonen der Atome mit ungerader Nukleonenzahl verfügen über einen kreiselähnlichen Eigendrehimpuls um die eigene Achse. Diese sogenannten Kernspins bewirken eine rotierende elektrische Ladung und induzieren ein schwaches Magnetfeld, das magnetische Moment. Wird nun ein starkes externes Magnetfeld angebracht, neigen die Kernspins zunächst dazu, der Richtung des Magnetfelds auszuweichen. Diese Präzessionsbewegung erfolgt mit einer charakteristischen Frequenz, die Larmorfrequenz genannt wird.⁴⁰ Sie ist proportional zur Stärke des Magnetfeldes. Die Spins richten sich erst allmählich parallel entlang der Magnetfeldrichtung aus. Durch gepulste Hochfrequenzstrahlung gleicher Frequenz findet eine Energieübertragung auf die Protonen, die sogenannte Anregung, statt, welche die Präzessionsbewegungen synchronisiert. Die Atomkerne lassen sich dadurch auf ein höheres Energieniveau anheben und kehren nach Abschalten des Impulses in ihren Grundzustand zurück, was als Relaxation bezeichnet wird. Der magnetische Impuls, der bei diesem Vorgang durch die aufgenommene und abgegebene Energie entsteht, kann als Kernspinresonanzsignal dargestellt werden. Dabei dienen Gradientenspulen im Inneren des Hauptmagneten der Ortslokalisierung der Signale.

Neben ¹H kommen weitere MRT-aktive Isotope zum Einsatz, zum Beispiel ¹³C, ¹⁷O oder auch ¹⁹F. Besonders das Fluorisotop ¹⁹F ist von Interesse, da es nicht nur eine ähnliche Empfindlichkeit wie der ¹H-Kern aufweist, sondern auch physiologisch in Wirbeltieren nicht vorkommt.³⁹ Diese Eigenschaft ermöglicht eine exakte und artefaktfreie Signaldetektion fluorhaltiger Kontrastmittel. Eine exakte anatomische Lokalisation der ¹⁹F-haltigen Verbindungen innerhalb des Körpers lässt sich durch die ¹H/¹⁹F-MR-Bildgebung umsetzen.⁴¹

1.4.1. PFCs in der MR-Bildgebung

Wie oben beschrieben hat die ^{19}F -Magnet-Resonanz-Tomographie bereits einen hohen Stellenwert in der medizinisch-diagnostischen Bildgebung. Die Nachfrage nach für bildgebende Verfahren geeignete und *in vivo* anwendbare ^{19}F -haltige Kontrastmittel ist somit groß. Zu den ^{19}F -haltigen Substanzen zählen unter anderem vollständig mit Fluor substituierte Kohlenstoffketten - die chemisch inerten und nichttoxischen Perfluorkarbone. Perfluorkarbone sind wasserunlöslich und werden aufgrund dessen in Lipiden emulgiert, bevor sie als Kontrastmittel eingesetzt werden können. Als Emulgator kommen Phospholipide zum Einsatz, die Prozessierung erfolgt mittels Hochdruckhomogenisation. Die dabei entstehenden Emulsionen, die Perfluorkarbon-Nanoemulsionen, zeichnen sich durch ihren hohen ^{19}F -Gehalt aus. Diese Eigenschaft macht sie zu für die ^{19}F -MR-Bildgebung gut geeigneten organischen Molekülen⁴², die insbesondere in der Darstellung inflammatorischer Prozesse Anwendung finden. In verschiedenen Mausmodellen konnte bereits anhand der *In-vivo*- ^{19}F -MRT demonstriert werden, dass mit PFCs beladene Immunzellen in inflammatorischen Herden akkumulieren, nachdem experimentell ein Myokardinfarkt, ein zerebraler Infarkt⁴³ oder auch eine Myokarditis⁴⁴ induziert wurden. Dabei wurde außerdem festgestellt, dass PFCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vornehmlich von zirkulierenden phagozytisch aktiven Zellen wie Monozyten inkorporiert werden.⁴³

Anhand ihrer Struktur lassen sich verschiedene Perfluorkarbone unterscheiden. In dieser Arbeit werden Emulsionen auf Basis von Perfluor-15-Kronen-5-Ether (PFCE) und Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan (PFCH) verwendet. Um auch andere Zellgruppen unverkennbar mit den PFCs markieren und mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung visualisieren zu können, muss eine zielgerichtete Steuerung der Emulsionen im aktiven Targeting erfolgen. Umgesetzt wird dies durch die Funktionalisierung der Emulsionen.

1.5. Drug Targeting

„Drug Targeting“ bezeichnet Methoden zur selektiven Anreicherung und Freisetzung von Arzneistoffen an einem oder mehreren gewünschten Wirkorten. Dazu gehören die direkte Verabreichung des Medikaments in das betroffene Areal, das passive Targeting durch undichte Gewebs- und Gefäßstrukturen und das „physikalische“ Targeting, welches durch abnorme Temperaturen oder pH-Werte im Gewebe möglich ist. Weiterhin abzugrenzen ist das magnetische Targeting unter Einsatz eines externen Magnetfeldes und paramagnetischen Trägern sowie das aktive Targeting unter Verwendung von Vektormolekülen.⁴⁵

1.5.1. Passives Targeting

Bei dem passiven Targeting handelt es sich um den passiven Transport sowie die Anreicherung von Substanzen wie Arzneistoffen, Kontrastmitteln oder Nanopartikeln (NPs) an einem bestimmten Ort im Organismus. Es basiert auf strukturellen Veränderungen der Gewebsarchitektur und der physiologischen Barrieren wie dem Gefäßendothel, die grundsätzlich im Zuge von Infektionen und Neoplasien verursacht werden. Auch der im Gewebe vorherrschende Konzentrationsgradient und pH-Wert für eine Substanz sowie eine verstärkte Durchblutung beeinflussen das Migrationsverhalten der Stoffe.⁴⁵ Insbesondere bei Tumoren sind wegen ihres schnellen Wachstums Zellkontakte gelockert oder aufgrund unzureichender Ausbildung undicht. Bei der Verabreichung von Nanocarriern, also Nanomaterial, welches als Transportmodul verwendet wird, oder Medikamenten macht man sich dies zu Nutze, da solche zwar in das geschädigte Gewebe extravasieren, es aber nicht durch die intakten Kapillaren verlassen können. Auf diese Weise akkumuliert der Wirkstoff und verbleibt am Zielort - dieses Phänomen ist als *EPR-Effekt (Enhanced Permeation and Retention)* bekannt.⁴⁶ Eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration kann den Therapieerfolg maximieren oder eine lokalspezifische Bildgebung erlauben.

1.5.2. Aktives Targeting

Im Gegensatz zum passiven Targeting werden beim aktiven Targeting Substanzen zur ortsgenauen Anhäufung gezielt gelenkt. Zu den Vorteilen des aktiven Targetings zählt nicht nur die systematische Applizierung von Medikamenten an gewünschten Zielorten, sondern auch deren kontrollierte Dosierung, die Modulation der Immunogenität und Toxizität einer Substanz und die Möglichkeit ihres Einsatzes in der (Früh-)Diagnostik und Bildgebung.⁴⁷ Überdies ist man hier im Gegensatz zum passiven Targeting nicht an pathologische Gewebeeigenschaften gebunden, sondern kann das Verfahren auch an gesundem Gewebe nutzen. Es handelt sich also um eine Beeinflussung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zwischen Vektor und spezifischen Zellstrukturen, den Targets. Möglich wird das aktive Targeting durch die Oberflächenmodifikation von Vektoren mit Antikörpern, Antikörperfragmenten oder auch Peptidkonjugaten.⁴⁸ Eine große Rolle spielen hierbei Nanopartikel, die mit Wirkstoffen und anderen Liganden beladen werden können. Man unterscheidet lipide, polymere und metallische/inorganische Nanopartikel. Metallische Nanosysteme, unter denen die superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel (SPIOs) zu nennen sind, finden bereits einen breiten Einsatz in bildgebenden Verfahren.⁴⁹ Andere Nanopartikel sind vielmehr in der Chemotherapie mit dem Ziel einer Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe relevant.⁵⁰ Auch die Perfluorkarbon-Nanoemulsionen, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, zählen zur Gruppe der Nanopartikel.

1.5.3. Nutzung der Biotin-Avidin-Interaktion im aktiven Targeting

Avidin setzt sich als tetrameres Glykoprotein aus vier identischen Untereinheiten zusammen, welche mit hoher Spezifität und Affinität je ein Molekül Biotin binden können und wird ursprünglich aus den Eiern von Vögeln, Reptilien und Amphibien gewonnen.⁵¹ Biotin ist als wasserlösliches Vitamin (Vitamin H, Vitamin B7, Coenzym R) ein essenzieller Nährstoff für alle lebenden Organismen, der in vielen pflanzlichen und tierischen Nahrungsquellen vorkommt.⁵² Als prosthetische Gruppe für verschiedene Carboxylasen und Decarboxylasen reguliert es zahlreiche biologische Prozesse wie die Gluconeogenese, Lipogenese, Fettsäuresynthese und den Katabolismus verzweigtkettiger Aminosäuren sowie von Valin und Isovalerat.⁵³ Biotin ist zudem kovalent an Lysinreste in Histonen gebunden, wodurch es die Chromatinstruktur beeinflusst und somit einen Einfluss auf die Genregulation hat.⁵⁴ Darüber hinaus kann Biotin über seine relativ inerte Seitenkette kovalent an fast alle Arten von bioaktiven Molekülen gebunden werden, ohne die Avidin-Bindungsstelle zu beeinträchtigen.

Die Biotin-Avidin-Interaktion ist die stärkste bekannte nichtkovalente Wechselwirkung zwischen einem Protein und einem Liganden. Sie ist etwa 10^3 - bis 10^6 -mal stärker als eine Antikörper-Antigen-Wechselwirkung⁵¹ und wird weder durch extreme pH-Werte, Temperaturen, organische Lösungsmittel noch andere Denaturierungsmittel beeinträchtigt.^{51,55,56} Des Weiteren können Biotinmoleküle an Proteine und andere Moleküle konjugiert werden, ohne deren biologische Aktivität wesentlich zu verändern.

Die Avidin-Biotin-Technologie wird bereits in verschiedenen Verfahren untersucht und angewandt, darunter auch in Pretargeting-Ansätzen: Je nach Aufbau des Targetings und der Anzahl an beteiligten Substanzen lassen sich einstufige von mehrstufigen Verfahren unterscheiden. Bei einstufigen Pretargeting-Ansätzen wird eine Biotin-Bindung an zu verabreichende Substanzen hergestellt, indem beispielsweise ein Therapeutikum mit einem biotinylierten Antikörper markiert wird, welcher spezifisch an die Zielzellen bindet.⁵⁷ Im Gegensatz zur direkten Gabe bewirkt die zielgerichtete Steuerung des Wirkstoffes eine Reduzierung dessen Menge, die frei im Umlauf ist, was das Expositionsverhältnis zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe verbessert. Mehrstufige Pretargeting-Methoden bedienen sich der Avidin-Biotin-Interaktion. Dabei werden an Streptavidin oder Avidin konjugierte Antikörper verwendet, um die Bindung von Biotin zu ermöglichen, oder auch biotinylierte Antikörper, die mit Avidin oder Streptavidin einen Komplex bilden können. Angewendet wurde dies bereits in der Bildgebung von Lungenkarzinomen mit Indium¹¹¹-markiertem Biotin.⁵⁸ Weitere Verfahren inkludieren die genetische Modifizierung von Tumorzellen⁵⁹ und Vektoren wie Retroviren⁶⁰ zur Oberflächenexpression von Avidin oder Biotin.

Die Vorteile des Biotin-Avidin gestützten Targetings liegen vor allem in der präzisen Ansteuerung von Zielzellen und einer daraus resultierenden Effizienz im Rahmen therapeutischer und bildgebender Intentionen sowie der Toxizitätsminderung von Wirkstoffen auf den Organismus.^{61,62}

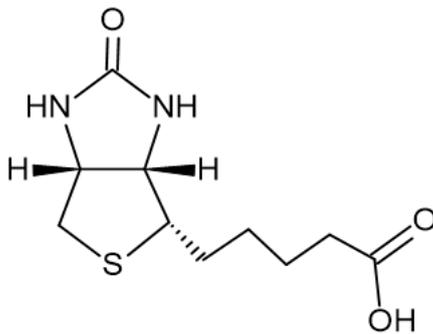


Abbildung 2: Strukturformel von Biotin. Quelle: Eigene Darstellung, erstellt mit ACD/ChemSketch.

1.6. Möglichkeiten der Funktionalisierung von PFCs

Ein aktives Targeting von bestimmten Strukturen, die im passiven Targeting nicht oder nur unzureichend mit PFCs markiert werden, kann über die Oberflächenfunktionalisierung von PFCs erreicht werden. Dazu werden Liganden wie Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide oder auch Proteine wie Avidin über eine reaktive Maleimidgruppe oder Biotinmoleküle an einen Cholesterin-Polyethylenglykol-Anker gekoppelt, welcher in die Partikeloberfläche der Emulsionen integriert wird.⁶³

1.6.1. PEGylierung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen

Unter der PEGylierung von Nanosystemen wie PFCs versteht man die Integration von Polyethylenglykol (PEG) in die Lipidschicht der Emulsion. Während des Herstellungsprozesses kann der Nanoemulsion ein PEG-Konjugat (zum Beispiel DSPE-mPEG₂₀₀₀) zugefügt werden. Mittels SPIT (Sterol-basierte-Post-Insertions-Technik) können auch vorgefertigte PFCs mit Cholesterolkonjugierten PEG-Ketten ausgestattet werden.⁶⁴ Die PEGylierung verhindert eine Opsonierung der Emulsionen. Die Opsonierung bezeichnet den Vorgang der Markierung bestimmter Mikroorganismen durch Antikörper und das Komplementsystem. Indem die PEGylierung die Bindung von Serumproteinen an die Partikel beeinträchtigt, kann die passive Aufnahme der PFCs durch phagozytisch aktive Zellen wie Monozyten und Granulozyten stark reduziert werden, während die Zielzellen weiterhin angesteuert werden. Gleichzeitig wird dabei die Halbwertszeit und Retention der Partikel *in vivo* erhöht.⁶⁵ Man nutzt die PEGylierung zur Optimierung des aktiven

Targetings und einer damit verbundenen eindeutigeren Darstellung einer bestimmten Zellgruppe. Die Effekte des Targetings PEGylierter PFCs konnten bereits in anderen Arbeiten beschrieben werden.⁶³

1.7. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die spezifische Markierung humaner CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit Perfluorkarbon-Nanoemulsion und die Darstellung dieser Zellgruppe im ¹⁹F-MRT.

Im ersten Schritt der Arbeit soll das passive Aufnahmeverhalten von PFCs durch Leukozyten, im Besonderen durch die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, untersucht werden. Im zweiten Schritt soll beurteilt werden, welchen Einfluss eine PEGylierung der PFCs auf die zelluläre Aufnahme dieser nimmt. Dazu werden die PFCs, die im passiven Targeting verwendet werden, mittels SPIT (Sterol-basierte-Post-Insertions-Technik) PEGyliert. Das aktive Targeting von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen soll mithilfe biotinylierter CD4-Antikörper erfolgen. Vor dessen Umsetzung soll zunächst die Spezifität der CD4-Antikörper in der durchflusszytometrischen Analyse überprüft werden. Um eine unmittelbare Ansteuerung der Zellen zu gewähren, soll eine Bindung zwischen biotinylierten Antikörpern, Avidin und biotinylierten PFCs erfolgen. Diese Bindung soll eine verstärkte Markierung der Zellen sowie eine verbesserte Aufnahme der PFCs durch diese bewirken. Zusätzlich zur Biotinylierung der PFCs soll die Spezifität über die PEGylierung der Partikeloberfläche erreicht werden, sodass die Partikelaufnahme durch andere Zellpopulationen deutlich reduziert und das Signal der Zielzellen in der Durchflusszytometrie und ¹⁹F-MR-Bildgebung eindeutig abgrenzbar ist.

Alle Nanoemulsionen werden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und ihre Eigenschaften mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), Fluoreszenzspektroskopie und ¹⁹F-MRT charakterisiert

2. Material

2.1. Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Für die Arbeit verwendete Geräte und Apparaturen. Quelle: Eigene Darstellung

Gerät	Typenbezeichnung, Hersteller
Analysenwaagen	PA214, Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz) AG204 DeltaRange®, Mettler Toledo Ew, Kern
Dispergiergerät	T18 ULTRA-TURRAX®, IKA Werke (Staufen, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACSCanto™ II, BD Bioscience (San Jose, USA)
Fluoreszenzspektrometer	IVIS Lumina II, Caliper LifeSciences (Mainz, Deutschland)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Hochdruckhomogenisator	LV1, Microfluidizer (Newton, USA)
Inkubator	HERAcell 150i, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Magnetrührer	RCT basic, IKA Werke (Staufen, Deutschland)
MR-Microimagingssystem	Mini 0.5, Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
MR-Resonatorspule	25mm-birdcage, Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
MR-Spektrometer	9.4 T Avance III Wide Bore, Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
Partikelanalytoren	Nanotrac Wave II, Microtrac (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) NanoSight NS300, Malvern Panalytical Ltd. (Worcestershire, UK)
Pipetten	Research, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rotator	MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Stauschlauch	Prämeta (Troisdorf, Deutschland)
Schüttler	Edmund Bühler
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin (Berlin, Deutschland)
Vortexer	Reagenzglas-Vortex-Schüttler, VWR International (Darmstadt, Deutschland) REAX Top, Heidolph REAX 2000, Heidolph
Zentrifugen	5415D, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

	Universal 320R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	Allegra X-30R, Beckman Coulter (Brea, USA)

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Quelle: Eigene Darstellung

Material	Hersteller
Butterfly	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Butterflyaufsatz	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
EDTA-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Entsalzungssäulen	Zeba™ Spin Desalting Columns, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Hautantiseptikum (Octenisept)	Schülke & Mayr GmbH (Niederstedt, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen, Omnifix-F (1ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Vollentsalztes (deionisiertes) Wasser	-

2.3. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien. Quelle: Eigene Darstellung

Chemikalien	Molekulargewicht	Hersteller
Atto 488-DPPE	-	Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland)
Atto 647-DPPE	-	Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland)
Avidin-Agarose	-	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Carboxyfluorescein	-	-
Cholesterol-Polyethylenglykol ₂₀₀₀	2000 Da	Nanocs Inc. (New York, USA)
DAPI	350,25 g/mol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DiBlock (1-(Perfluor-n-hexyl)decan)	460,32 g/mol	abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Biotin	-	Avanti Polar Lipids (Alabama, USA)
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	4805,49 g/mol	Lipoid GmbH (Luswigshafen, Deutschland)
Lipoid® E80S	~ 780	Lipoid GmbH (Luswigshafen, Deutschland)
NeutrAvidin	~ 60 kDa	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Perfluor-15-kronen-5-ether	580,07 g/mol	abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Perfluor-1,3,5-trimethylcyclohexan	450,07 g/mol	abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Streptavidin, Alexa Fluor™ 647 Konjugat	-	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Streptavidin-FITC	-	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

2.4. Puffer und Medien

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Medien. Quelle: Eigene Darstellung

Puffer/Medien	Chemikalien oder Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN Biotech
Erythrozytenlysepuffer (pH = 7,4)	Hergestellt in der Zentralapotheke der Universitätsklinik Düsseldorf Zusammensetzung pro ml: 8,29 mg Ammoniumchlorid 1,00 mg Kaliumhydrogencarbonat 0,0375 mg Na-EDT
MACS-Puffer	Eigene Herstellung enthält: 2 mM EDTA 0,5 % BSA 500 ml PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphat-Glycerol-Puffer (pH = 7,4)	eigene Herstellung enthält: 1mM Phosphat 7mM Dinatriumhydrogenphosphat 3mM Natriumdihydrogenphosphat 2,5 % m/m Glycerol

2.5. Antikörper

Tabelle 5: Für das passive und aktive Targeting verwendete Antikörper. Quelle: Eigene Darstellung

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Firma
CD45	PerCP	2 D1	Maus	BioLegend
CD45	PE	-	-	Miltenyi Biotec
CD11b	PE/Cy7	M1/70	Ratte	BioLegend
CD11b	APC/FireTM 750	M1/70	Maus	BioLegend
CD3	APC/Cy7	OKT3	Maus	BioLegend
CD4	PE	OKT4	Maus	BioLegend
CD4-Biotin	-	OKT4	Maus	BioLegend
CD19	APC/Cy7	HIB19	Maus	BioLegend

2.6. Software

In dieser Arbeit wurde mit den Programmen Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010 und Microsoft PowerPoint 2010 gearbeitet. Für die Auswertung durchflusszytometrischer Analysen wurde das Programm „FlowJo“ von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) genutzt. Die statistische Auswertung wurde eigenständig mit Hilfe der Programme „GraphPad Prism“ und Microsoft Excel durchgeführt. Weitere Programme werden in direktem Zusammenhang mit der Methode erwähnt.

3. Methoden

3.1. Herstellung und Funktionalisierung von PFCs

Mithilfe von Hochdruckhomogenisation wurden in dieser Arbeit unter Verwendung der Perfluorkarbone PFCE und PFCH unterschiedliche Perfluorkarbon-Nanoemulsionen hergestellt. Für dieses Vorgehen wurde der Microfluidizer LV1 eingesetzt.

Produziert wurden mit DPPE-Atto647 bzw. DPPE-Atto488 markierte PFCH- und PFCE-Nanoemulsionen (A^{488} PFCE-; A^{488} PFCH-; A^{647} PFCE- und A^{647} PFCH-PFCs). A^{647} PFCE- und A^{488} PFCE-PFCs wurden in einem an die Herstellung anschließenden Prozess mit Polyethylenglykol (PEG) funktionalisiert (PEG- A^{647} PFCs; PEG- A^{488} PFCs). Weiterhin wurden mit Biotin funktionalisierte PFCE-Emulsionen hergestellt, die als Fluoreszenzmarker DPPE-Carboxyfluorescein und DPPE-Atto488 erhielten (Biotin.Cfl.PFCs; Biotin.A488.PFCs).

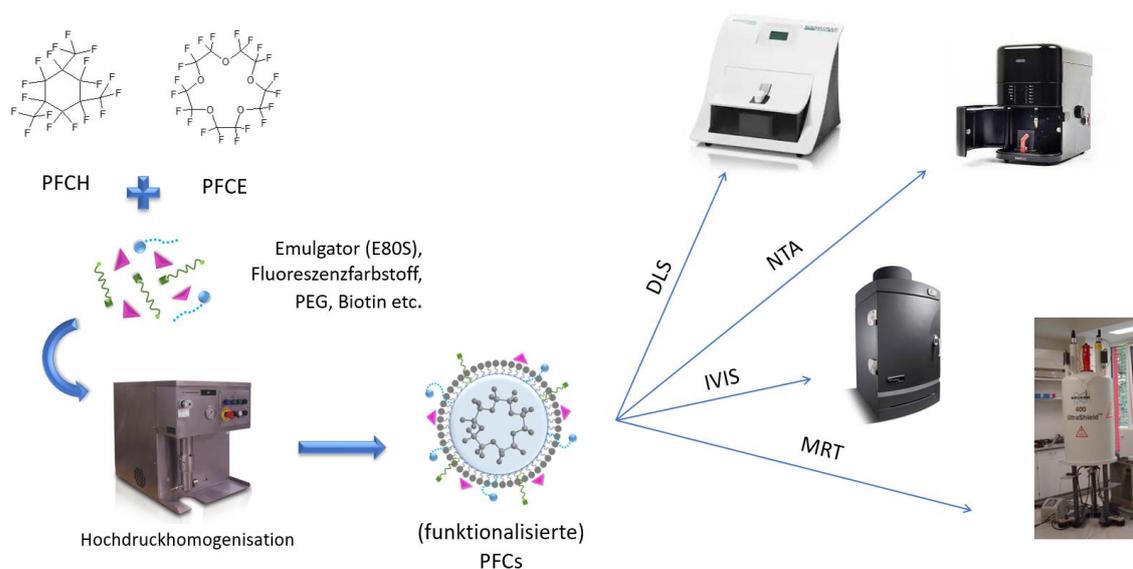


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Herstellung und Charakterisierung von Targeting-PFCs. Für die Herstellung der Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) wird zunächst das Phospholipid (E80S) in Phosphat-Glycerol-Puffer dispergiert und Perfluorkarbone sowie Fluoreszenzmarker und nach Bedarf weitere Komponenten wie z. B. Biotin oder Polyethylenglykol (PEG) hinzugefügt. Nach Herstellung einer Voremulsion erfolgt die weitere Homogenisation unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators. Die Eigenschaften der hergestellten PFCs werden durch dynamische Lichtstreuung (DLS), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), Fluoreszenzmessungen und MRT-Messungen charakterisiert. Quelle: Eigene Darstellung

3.1.1. Herstellung fluoreszenzmarkierter PFCs mittels Hochdruckhomogenisation

Die Herstellung der PFCs erfolgte unter Verwendung des Hochdruckhomogenisators Microfluidizer LV1. Unter der Hochdruckhomogenisation versteht man ein Prozedere, in welchem eine liquide Substanz durch ein System geschleust wird, welches die Homogenisierung und Reduzierung der Partikelgröße der Komponenten in dieser Flüssigkeit ermöglicht. Der Microfluidizer LV1 verfügt über eine Keramik-Interaktionskammer, durch deren Kanäle das zu prozessierende Material bei Drücken von bis zu 2069 Bar gepumpt wird. Dabei ist das Produkt konstant hohen Scherraten und Prallkräften unterworfen, welche eine Kollision der Partikel verursachen und somit die Reduzierung derer Größe auf unter 100 nm sowie die Homogenisierung des Gemisches bewirken.

Die Herstellung der PFCs erfolgte nach folgendem Prinzip: Zunächst wurden je 200 µg des Fluoreszenzfarbstoffs mit je 300 µl des Lipids E80S (100 mg/1 ml) im Ultraschallbad gelöst. 3,04 ml des vorgelösten Lipids, das Perfluorkarbon sowie das an das Lipid gekoppelte Fluorochrom wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und in einem isotonen Phosphat-Glycerol-Puffer (pH 7,4) dispergiert. Der Perfluorkarbon-Anteil betrug für PFCH-Emulsionen 40 % und für PFCE-Emulsionen 20 %. Abhängig vom genutzten Perfluorkarbon wurden dem Gemisch demnach 2 g PFCE beziehungsweise 4 g PFCH für einen Ansatz mit einem Zielgewicht von 10 g zugefügt. Anschließend wurde die Probe mit einem isotonen Phosphat-Glycerol-Puffer (pH 7,4) auf 10 g dispergiert. Zur Stabilisierung wurden PFCH-Emulsionen durch 184 mg DiBlock (1-(Perfluor-n-(hexyl)decan) ergänzt, welcher ein Herauslösen des PFCHs aus der Lipidhülle verhindert. Aufgrund der zirkulären Struktur und dadurch hohen Stabilität des PFCEs war die Verwendung eines DiBlocks hier nicht nötig. Nach Erzeugen einer Voremulsion mit dem Dispergiergerät „Ultra Turrax“ wurden diese für drei bis fünf Zyklen in der Hochdruckhomogenisation bei 1000 Bar prozessiert und nach Fertigstellung bei – 80 °C gelagert.

Für die Herstellung von 40 mM PFCs wurden folgende Einwaagen verwendet:

Tabelle 1: Bestandteile und Einwaagen der PFCs für das passive Targeting. Quelle: Eigene Darstellung

	^{A488} PFCE	^{A488} PFCH	^{A647} PFCE	^{A647} PFCH
Perfluorkarbon	20 %	40 %	20 %	40 %
Gesamtlipidgehalt	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
Lipid E80S	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
DiBlock	-	184 mg	-	184 mg
Fluoreszenzfarbstoff	200 µg	200 µg	200 µg	200 µg

Phosphat-Glycerol-Puffer	auf 10 g	auf 10 g	auf 10 g	auf 10 g
---------------------------------	----------	----------	----------	----------

3.1.2. Funktionalisierung der PFCs mit Biotin

In einem weiteren Schritt wurden biotinylierte ^{Cfl}- und ^{A488}-PFCE-PFCs produziert. Zu Beginn wurde dafür das Lipidgemisch mit der hydrophilen Phase vermengt. Dazu wurde das vorgelöste Lipid E80S, das DSPE-PEG₂₀₀₀ und das DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotin bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 7,4 g des Phosphat-Glycerol-Puffers mittels Magnetrührer dispergiert. Anschließend wurde der vorher in Lipid gelöste Fluoreszenzfarbstoff und das PFCE hinzugegeben. Ein Ansatz erhielt 100 µg des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluorescein, ein weiterer 200 µg Atto488-DPPE. Nach Erzeugen einer Voremulsion mit dem „Ultra Turrax“ und drei Zyklen Hochdruckhomogenisation à 1000 Bar wurden die PFCs bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Für die Herstellung von 35 mM PFCs wurden folgende Einwaagen verwendet:

Tabelle 2: Bestandteile und Einwaagen der ^{Biotin.Cfl}-PFCs. Quelle: Eigene Darstellung

	0 mol% Biotin-PFCE	0,1 mol% Biotin-PFCE	0,01 mol% Biotin-PFCE
Perfluorkarbon	10 %	10 %	10 %
Gesamtlipidgehalt	35 mM	35 mM	35 mM
Lipid E80S	33,25 mM	33,215 mM	33,2465 mM
DSPE-PEG₂₀₀₀	5 mol%	5 mol%	5 mol%
DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotin	0 mol%	0,1 mol%	0,01 mol%
Fluoreszenzfarbstoff	100 µg	100 µg	100 µg
Phosphat-Glycerol-Puffer	auf 10 g	auf 10 g	auf 10 g

Tabelle 3: Bestandteile und Einwaagen der ^{Biotin.A488}-PFCs. Quelle: Eigene Darstellung

	0 mol% Biotin-PFCE	0,1 mol% Biotin-PFCE
Perfluorkarbon	10 %	10 %
Gesamtlipidgehalt	35 mM (100 %)	35 mM (100 %)
Lipid E80S	33,25 mM (95 %)	33,215 mM (94,9 %)
DSPE-PEG₂₀₀₀	5 mol% (5 %)	5 mol% (5 %)
DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotin	0 mol% (0 %)	0,1 mol% (0,1 %)

Fluoreszenzfarbstoff	200 µg	200 µg
Phosphat-Glycerol-Puffer	auf 10 g	auf 10 g

3.1.3. PEGylierung der PFCs mittels Sterol-basierter-Post-Insertions-Technik (SPIT)

Polyethylenglykol, kurz PEG, ist ein nichttoxisches Polymer, welches in der Nanomedizin genutzt wird, um über eine Oberflächenmodifikation von Partikeln eine Reduzierung der Opsonierung und somit eine reduzierte Aufnahme durch phagozytisch aktive Zellen zu bewirken.^{66–68} Die PEGylierung kann mit DSPE-PEG₂₀₀₀ während der PFC-Herstellung oder im Anschluss mittels Sterol-basierter-Post-Insertions-Technik, kurz „SPIT“, erfolgen. Die „SPIT“ ist eine Methode, welche eine PEGylierung vorgefertigter PFCs, das bedeutet ein Einfügen von Polyethylenglykol in die Lipidschicht der Emulsionen, ermöglicht. Je nach Bedarf können weitere funktionelle Gruppen, wie beispielsweise Maleimid, mit dem Cholesterin-PEG-Anker chemisch verknüpft werden, über welche dann eine gewünschte Funktionalisierung der PFCs erfolgen kann.

Verwendet wurde in dieser Arbeit Cholesterol-Polyethylenglykol₂₀₀₀ (Chol-PEG). Da dieses als Lyophilisat vorlag, wurde es zunächst in Phosphat-Glycerol-Puffer gelöst, sodass eine PEG-Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/µl entstand. Mittels der SPIT kann nicht sicher gesagt werden, wie hoch der Anteil der PEG-Ketten ist, die tatsächlich in die Lipidhülle inseriert werden. Daher wurden die PFCs mit verschiedenen Anteilen der PEG-Lösung, und zwar 0 mol%, 5 mol%, 10 mol% und 20 mol% im Verhältnis zur Lipidgesamtmenge der PFCs, inkubiert. Um dies zu erzielen, wurden je 100 µl vorgefertigter ^{A488}PFCE- bzw. ^{A647}PFCE-PFCs 0 µl, 8 µl, 16 µl beziehungsweise 32 µl der PEG-Lösung hinzugegeben und das Gemisch mit Phosphat-Glycerol-Puffer auf 150 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur und lichtgeschützt im Rotationsschüttler. Auf diese Weise wurden Nanoemulsionen mit Chol-PEG-Anteilen von 0 mol%, 5 mol%, 10 mol% und 20 mol% im Verhältnis zur Lipidgesamtmenge der PFCs hergestellt.

3.1.4. Funktionalisierung von ^{Biotin}-PFCs mit NeutrAvidin

Die Kopplung von NeutrAvidin an biotinylierte PFCs stellt eine weitere Möglichkeit der Funktionalisierung der Partikel dar. Für die Herstellung dieser Avidin-Biotin-PFCs wurden je 50 µl NeutrAvidin in 200 µl vorgefertigten ^{Biotin.A488}PFCE-PFCs resuspendiert. Ein weiterer Ansatz wurde mit 200 µl nicht-biotinylierten ^{A488}PFCE-PFCs inkubiert und diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 20.000 xg für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das PFC-Pellet mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei gleichbleibenden Einstellungen

und das Pellet wurde erneut gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 200 µl Phosphat-Glycerol-Puffer resuspendiert. Der Vorgang wurde durch Vortexen der Probe und mittels Ultraschallbad unterstützt, bis sich das Pellet in dem Puffer gelöst hat und eine homogene Emulsion vorlag. Die ^{Av}Biotin-PFCs wurden dann bei 4 °C gelagert.

3.2. Charakterisierung von PFCs

Im Anschluss an die Herstellung wurden die Nanoemulsionen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), Fluoreszenzmessungen (IVIS) und ¹⁹F-Magnetresonanztomographie charakterisiert. Die Untersuchungen sollten unter anderem Informationen über die Partikelgröße, -konzentration, Größenverteilung, das Zeta-Potenzial, den Fluorgehalt und die Fluoreszenzintensität liefern.

3.2.1. Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch quasielastische Lichtstreuung (QELS), ist eine Methode zur Analyse von Größen und Größenverteilungen von in Emulsionen oder Flüssigkeiten dispergierten Molekülen oder Partikeln. Möglich ist dies durch die Analyse der mittels Laser verursachten Lichtstreuung. Ebenfalls mit der DLS durchführbar ist die Messung des Polydispersitätsindex (PDI), der die Breite der Molmassenverteilung beschreibt. Das bedeutet, dass der PDI die Dispersität von kolloidalen Systemen wiedergibt, als Maß für die Breite der Größenverteilung dient und mit der Partikelgröße korreliert. Je stärker die Größe der einzelnen Partikel voneinander abweicht, desto breiter ist die Verteilung. Der Zahlenwert, der durch den PDI angegeben wird, beträgt einen Wert zwischen 0,0 und 1,0. Ein Wert < 0,1 weist auf eine monodisperse Verteilung hin und ein Wert zwischen 0,1 und 0,2 auf eine geringe Dispersität, Werte > 0,7 hingegen sprechen für eine breite Größenverteilung mit mehreren Partikelgrößenpopulationen, z. B. bei Polydispersität der Partikel.⁶⁹ Ein kleiner PDI spricht demnach für eine niedrige durchschnittliche Partikelgröße und eine hohe Homogenität der Partikel. Das ζ-Potenzial, das mit dieser Technik auch gemessen werden kann, ist das elektrische Potenzial (auch bezeichnet als Coulomb-Potenzial) an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Suspension oder Emulsion.

Gearbeitet wurde in diesem Fall mit dem Nanotracs Wave II der Firma Microtrac (Retsch GmbH, Haan, Deutschland), welcher Partikelgrößen im Bereich von 0,8 nm bis 6,5 µm messen kann. Beim Verfahren der dynamischen Lichtstreuung wird eine kohärente monochromatische Lichtquelle, das Laserlicht, durch einen Polarisator auf das Probenvolumen gelenkt. Das hier verwendete Gerät verfügt über einen faseroptischen Adapter mit einem Y-Teiler. An der Spitze der Sonde befindet sich

Saphirglas, welches einen Teil des Laserstrahls reflektiert und zu einem Photodiodendetektor zurücklenkt. Außerdem wird das Laserlicht auf die Partikel in der Suspension gerichtet. Die in der Suspension gegebene Brownsche Molekularbewegung der Partikel oder Moleküle bewirkt die Streuung des Laserstrahls unterschiedlicher Intensitäten. Mit Bezug zur Stokes-Einstein-Theorie, nach welcher die Diffusionsgeschwindigkeiten umgekehrt proportional zur Partikelgröße sind, bedeutet eine höhere Flussgeschwindigkeit geringere Partikelgrößen und gleichermaßen eine niedrigere Flussgeschwindigkeit höhere Partikelgrößen. Die Information über die Geschwindigkeit der Teilchenbewegung in der Lösung erlaubt somit zum Beispiel die Erfassung des hydrodynamischen Durchmessers. Das Streulicht der Partikel wird um 180° zurück zum Photodiodendetektor gelenkt. Dieses Streulicht interferiert mit dem anderer Streuzentren, da sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung die Abstände dieser zueinander ständig ändern. Somit unterliegen die Streuintensitäten konstanten Schwankungen. Das hier verwendete Gerät arbeitet mit einer laserverstärkten Detektionsmethode. Dementsprechend werden die beiden Amplituden, also die des reflektierten Laserlichts und die kleinere Amplitude des Streulichts, addiert und somit ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermöglicht.

Zur Durchführung der Messungen wurden je $20\ \mu\text{l}$ des PFCs im Verhältnis 2:100 in $980\ \mu\text{l}$ vollentsalztem Wasser verdünnt. Pro Messung wurden somit $1000\ \mu\text{l}$ einer Verdünnung in die Messküvette transferiert. Für jede Emulsion wurden sechs Messungen mit fünf Zyklen à 30 Sekunden durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für Partikelgröße, PDI und ζ -Potenzial angegeben und die Daten mit GraphPad Prism weiterverarbeitet.

3.2.2. Charakterisierung mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse ist, ähnlich wie die dynamische Lichtstreuung, ein Verfahren, welches sich die Lichtstreuung und die Brownsche Molekularbewegung zu Nutze macht, um die Analyse von Partikelgrößenverteilungen in flüssigen Medien zu ermöglichen.

Es können Partikel im Größenbereich von $10 - 2000\ \text{nm}$ gemessen werden, wobei die minimal erfassbare Größe von Faktoren wie der Art des Materials, der Wellenlänge und Leistung der Beleuchtungsquelle sowie der Empfindlichkeit der Kamera abhängt. Die obere Grenze des Messbereichs ist vor allem durch die bei wachsender Größe der Partikel nachlassende Brownsche Bewegung limitiert. Im Gegensatz zur oft genutzten Methode der DLS können bei der NTA die Partikel in Echtzeit visuell dargestellt werden. Weitere Parameter, die erfasst werden können, sind die Fluoreszenz von Partikeln und der PDI. Des Weiteren kann es Partikelkonzentrationen in einem Rahmen von 10^6 bis 10^9 Partikel/ml erfassen.

Das hier verwendete Gerät „NanoSight NS300“ der Firma Malvern Panalytical Ltd. (Worcestershire, UK) verfügt über verschiedene Lichtfilter, die die Messung der Fluoreszenz von markierten und nichtmarkierten Nanopartikeln erlauben. Die Probe wird für die Messungen in die Zählkammer transferiert und von einem Laser angestrahlt. Sobald das Licht auf die Partikel in der Suspension trifft, wird es gebrochen. Die Videokamera registriert das dabei entstehende Streulicht und visualisiert die Einzelpartikel mittels eines Mikroskops in 20-facher Vergrößerung. Dadurch können Veränderungen innerhalb der Probe, wie zum Beispiel eine Aggregatbildung, in Echtzeit auf dem Bildschirm abgebildet werden. Zudem wird eine Videodatei der Partikel in Bewegung erstellt, sodass das Programm die Moleküle separat verfolgen und den hydrodynamischen Durchmesser nach der Stokes-Einstein-Gleichung berechnen kann. Zur Durchführung der Messungen wurde je 1 µl der Emulsionen im Verhältnis 1:1000 in 999 µl MilliQ-Wasser verdünnt und mit dieser Lösung weitere Verdünnungsreihen von 1:10.000 und 1:100.000 angesetzt. Die Verdünnungsstufe wurde später in die Berechnung der Partikelkonzentration einbezogen. Das Gerät der Firma Malvern Panalytical wird mit zwei Messkammern geliefert, der *Flow-cell top-plate* und der *O-ring top-plate*. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde die *Flow-cell top-plate* genutzt. Nach transferieren der verdünnten Emulsion mit einer 1 ml Spritze in die *Flow-cell top-plate* über den zuführenden Schlauch wurde diese auf der optischen Fläche des Lasermoduls positioniert und befestigt. Für jede Emulsion wurden sechs Messungen mit fünf Zyklen à 60 Sekunden durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für Partikelgröße und Partikelkonzentration/ml angegeben und die Daten mit GraphPad Prism weiterverarbeitet.

3.2.3. Messung der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung der Fluoreszenzeigenschaften der PFCs wurde mit dem *IVIS Lumina II* von Caliper LifeSciences durchgeführt. Dieses Bildgebungssystem kombiniert optische 2D- und 3D-Tomographie, um *in vivo* als auch *ex vivo* Fluoreszenzaufnahmen zu erzeugen. Die Fluoreszenzsignale können von dem Gerät sowohl quantitativ ausgewertet als auch visuell über Fotoaufnahmen dargestellt werden.

Für die Messungen der PFCs wurden je 10 µl eines PFCs neben 10 µl einer nichtfluoreszierenden PFOB-Emulsion auf eine Glasplatte pipettiert. Die Anregung wurde für die A488-markierten PFCs auf 465 nm und die Emission auf GFP (Grün fluoreszierendes Protein) eingestellt, für die A647-markierten PFCs auf 640 nm und Cy5.5 (Cyanine-5.5). Mit der *Living Image Software* wurden die PFCs mittels *Measurement-ROIs (Region of interest)* gekennzeichnet und die Signale quantitativ ausgewertet. Zudem wurde bei jeder Messung das Hintergrundsignal anhand eines *Background-ROIs* bestimmt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die erhaltenen Werte in Microsoft Excel übertragen. Um das mittlere Fluoreszenzsignal (MFI) zu bestimmen, wurde von den Messwerten

der PFCs dann das Hintergrundsignal subtrahiert. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism.

3.2.4. Charakterisierung mittels ^{19}F -MRT

In dieser Arbeit wurden alle MRT-Messungen mit einem 9,4 Tesla Bruker Avance III NMR-Spektrometer durchgeführt, das mit Frequenzen von 400,21 MHz für ^1H -Messungen und 376,54 MHz für ^{19}F -Messungen arbeitet. Es wurden sowohl ^1H - als auch morphologisch angepasste Bilder des Fluor-Signals erstellt, um dann mit $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Überlagerungsbildern das Signal genau lokalisieren zu können. Verwendet wurde der Probenkopf BC25.

Für die Messungen der PFCs wurden je 10 μl dieser in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt, an einem mit vollentsalztem Wasser gefüllten 2 ml Reaktionsgefäß befestigt und im Probenkopf positioniert. Für die ^1H -Scans wurde zunächst ein Sagittalschnitt, der als Übersichtsaufnahme für die Lokalisation der PFCs separat durchgeführt. Danach wurde ein Axialschnitt mit einer Schichtdicke von 3-5 mm so gelegt, dass die Emulsionen gleichzeitig in einer Ebene erfasst werden konnten. Für die ^{19}F -Scans wurde die Geometrie übernommen. Entsprechende ^{19}F -Scans wurden mit 32 Mittelungen durchgeführt. Die Scanzeiten lagen jeweils bei etwa fünf Minuten. Anschließend wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit dem Programm „SNR Tool“ ausgewertet. Die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Überlagerungsbilder wurden mit dem Programm „Overlay Tool“ angefertigt. Beide Programme wurden von der Arbeitsgruppe des Instituts für Molekulare Kardiologie (Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland) entwickelt.

3.3. Validierung der PFC-Biotinylierung

In einem weiteren Schritt sollte die Integration von Biotin in die Lipiddoppelschicht von $^{\text{Biotin.Cfl}}$.PFCE-PFCs und $^{\text{Biotin.A488}}$.PFCE-PFCs validiert werden. Dazu wurde zunächst der Inhalt von Entsalzungssäulen ausgewaschen, sodass nur noch mit der Säule, welche einen Filter enthält, weitergearbeitet wurde. Verwendet wurden die *ZebaTM Spin Desalting Columns* von Thermo Fisher (Rockford, USA). Jede Säule wurde mit 200 μl der Avidin-Agarose befüllt und anschließend wurden 200 μl des entsprechenden PFCs hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 30 Minuten auf einem Schüttler lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Säulen am Boden geöffnet, sodass Flüssigkeit, die nicht von dem Filter zurückgehalten wird, abfließen konnte. Zudem wurden die Säulen mehrmals mit 500 μl Phosphat-Glycerol-Puffer gewaschen, sodass jegliche Substanz, die nicht an die Avidin-Beads gebunden hat, entfernt wurde.

Die weitere Untersuchung der Avidin-Biotin-Bindung erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie und ^{19}F -MRT. Die Messung der Avidin-Agarose-Säulen im IVIS erfolgte nach gleichem Prinzip wie die Messung der PFCs. Um das Fluoreszenzsignal in den Avidin-Agarose-Säulen zu messen und diese somit auf den PFC-Gehalt zu prüfen, wurden diese nebeneinander auf die Glasplatte gelegt. Nachdem ein Foto der Säulen aufgenommen wurde, konnten die durchschnittlichen Fluoreszenz- und Hintergrundsignale mithilfe von *ROIs* ermittelt werden. Auch bei diesen Messungen wurden die Daten in Microsoft Excel übertragen, verrechnet und anschließend mit Graphpad Prism weiterverarbeitet. Für die MRT-Messungen wurden die Avidin-Agarose-Säulen vor den Messungen abgedichtet, dann ebenfalls in den Probenkopf gelegt und ^1H -Scans mittels Sagittalschnitt als Übersichtsaufnahme, wie in 3.2.4. beschrieben, angefertigt. Für die ^{19}F -Scans wurde die Geometrie mit einer Schichtdicke von 3 mm übernommen. Korrespondierende ^{19}F -Scans wurden hier mit 128 Mittelungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte auch hier durch das Programm „*SNR Tool*“ und „*Overlay Tool*“.

3.4. Durchflusszytometrische Analyse der zellulären PFC-Aufnahme

3.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bezeichnet eine Methodik, die auf Basis von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften die Analyse von Einzelzellen ermöglicht. Bei diesem Verfahren überführen hochpräzise Pumpen eine Probe in das Durchflusszytometer. Je präziser die Pumpe den Volumenstrom fördert, desto genauere Aussagen können über die Konzentration der partikulären Strukturen in der Probe gemacht werden. Die Testsubstanz mit der Zellsuspension passiert den Mikrokanal der Messküvette [Flusszelle („*Flow Cell*“)], welche aus Glas oder Quarz besteht, wobei jede Zelle mittels hydrodynamischer Fokussierung separat durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt wird. Sobald der Laser auf die Zelle trifft, erzeugt diese ein für ihren Zelltyp charakteristisches Streulicht, das „*Light Scatter*“. Die Intensität des Streulichts ist abhängig von der Komplexität der inneren und äußeren Struktur der Zelle und dient der Quantifizierung ihrer Größe und Granularität. Das Streulicht wird in der Regel an zwei Stellen gemessen, und zwar in Richtung des ursprünglichen Lichtstrahls, bezeichnet als Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*), sowie im 90° Winkel zu diesem. Letzteres wird als Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) bezeichnet. Wie sich das Vorwärtsstreulicht darstellt, ist abhängig von dem Volumen der Zelle – je größer die Zelle ist, desto intensiver ist das Streulicht. Die Detektion des Seitwärtsstreulichts als Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns sowie von weiteren Zellkompartimenten beeinflusst.

Zusätzlich können die zu analysierenden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert werden, um unter anderem auf Zellen befindliche Oberflächenproteine zu markieren. Nach Anregung durch einen Laser kann die für den Farbstoff charakteristische Lichtemission von zusätzlichen Detektoren im 90-Grad-Winkel quantifiziert werden. Welche Wellenlänge des emittierten Lichts einen Detektor erreicht, ist abhängig von optischen Filtereinheiten, die den Detektoren vorgeschaltet sind. So können durch den Einsatz mehrerer spezifischer Fluoreszenzparameter jeder Zelle Eigenschaften zugeordnet werden, was eine individuelle Analyse und Separation von Zellpopulationen erlaubt.

3.4.2. Ethikvotum

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erteilte am 03.07.2020 ihr positives Ethikvotum für die Studien-Nr.: 2020-989. Als Probanden kamen einwilligungsfähige Erwachsene im Alter von 18–49 Jahren in Frage.

3.4.3. Isolation von Leukozyten aus humanem Blut

Zur Gewinnung der Leukozyten wurde zunächst humanes Blut aus der *Vena mediana cubiti* von freiwilligen Spendern mittels Nadelpunktion entnommen. Die anschließenden Untersuchungen fanden ausschließlich *in vitro* statt. Das humane Blut wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Erythrozyten wurden je 2 ml Blut in 20 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, die Probe für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Fortan erfolgten alle weiteren Zentrifugationsschritte bei 300 xg für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und die Probe erneut bei gleichen Bedingungen lysiert. Anschließend wurde das Zellpellet zweimal mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die isolierten Leukozyten wurden schließlich in 10 ml DMEM oder MACS-Puffer aufgenommen.

3.4.4. Targeting von Leukozyten mit PFCs

Zur Durchführung des Targetings wurde in einem weiteren Schritt zunächst je 1 ml der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden dann mit je 30 µl, 20 µl, 5 µl und 5 µl einer 1:10 Verdünnung einer jeweiligen Perfluorokarbon-Emulsion (^{A488}PFCH-PFC, ^{A647}PFCH-PFC, ^{A488}PFCE-PFC und ^{A647}PFCE-PFC) für 20 Minuten in einem 37 °C-Schrank inkubiert. Eine Probe diente jeweils als Negativkontrolle (N.C.) und erhielt keine PFCs. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 300 xg für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Um verschiedene Zellpopulationen zu markieren, wurden die Zellpellets mit je 100 µl Master-Mix für 20 Minuten bei 4 °C gefärbt. Für die Erzeugung des Master-Mix wurden CD45-PerCp-, CD11b-PE/Cy7-, CD3-APC/Cy7- und CD4-PE-Antikörper in einem

Verhältnis von 1:100 in MACS-Puffer resuspendiert. Dies entspricht zum Beispiel 5 µl des CD45-Antikörpers auf 495 µl Puffer. Nach der Färbung wurden die Zellpellets mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Pellets in je 300 µl DAPI/MACS-Puffer (1:1000) und 200 µl MACS resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.4.5. Targeting von PEGylierten PFCs

Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Insertion von Polyethylenglykol-Ketten in die Lipidschicht der PFCs die PFC-Aufnahme durch Immunzellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden PEGylierte ^{A488}PFC-PFCs und ^{A647}PFC-PFCs mittels Sterol-basierter-Post-Insertions-Technik (SPIT) hergestellt.

Im Anschluss wurden Leukozyten aus humanem Blut, wie in 3.4.2. beschrieben, isoliert und in MACS-Puffer aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in FACS-Tubes überführt und mit 30 µl PEG-^{A488}PFC- bzw. PEG-^{A647}PFC-PFCs für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hierbei kamen PFCs zum Einsatz, die einen Cholesterin-PEG-Anteil von 0 mol%, 5 mol%, 10 mol% oder 20 mol% enthalten. Zwei Proben wurden ohne die Hinzugabe von PFCs inkubiert und dienten als Negativkontrollen. Nachfolgend wurden die Zellen bei 300 xg für fünf Minuten zentrifugiert und mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Für die Markierung der Zellen mit Antikörpern wurden die Pellets bei 4 °C für 20 Minuten mit je 100 µl Master-Mix, dessen Zusammensetzung 3.4.3. zu entnehmen ist, inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben, welche danach zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer gewaschen wurden. Schließlich wurden die Zellen mit DAPI (1 µl/ml) gefärbt, in 200 µl MACS aufgenommen und auf Eis gestellt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die zelluläre Aufnahme der PFCs durch die Leukozyten evaluiert.

3.4.6. Funktionalitätstest biotinylierter Antikörper

Um die Funktionalität der biotinylierten Antikörper und die Avidin-Biotin-Wechselwirkung vor Verwendung im aktiven Targeting zu testen, wurden Leukozyten aus humanem Blut mit biotinylierten Anti-CD4-Antikörpern und anschließend mit FITC-markiertem Streptavidin markiert.

Dafür wurde zunächst 1 ml humanes Blut in 15 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten ebenfalls unter diesen Einstellungen. Der Überstand wurde abgenommen und die Lyse wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Letzterer Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Je 200 µl der Zellsuspension wurden für 20 Minuten bei 4 °C mit den Antikörpern inkubiert. Verwendet wurden

CD45-PE-, CD11b-APC/Fire-, und biotinylierte CD4-Antikörper. Dabei diente eine Probe als Negativkontrolle und erhielt keinen biotinylierten Anti-CD4-Antikörper. Nach Inkubation folgte eine Zentrifugation mit anschließender Resuspension des Pellets in 200 µl MACS-Puffer und Inkubation mit je 1 µl FITC-Streptavidin für 20 Minuten bei 4 °C. Schließlich wurden die Zellpellets gewaschen, in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen, mit DAPI (1 µl/ml) gefärbt und die Zellen in der Durchflusszytomtrie analysiert.

3.4.7. Aktives Targeting von ^{Biotin}-PFCs und ^{Av.Biotin}-PFCs

Für das aktive Targeting humaner Leukozyten wurden biotinylierte Antikörper sowie biotinylierte PFCs verwendet, die über Avidin miteinander gekoppelt werden sollten. Der erste Schritt bestand in der Isolation von Leukozyten aus humanem Blut. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4 °C mit Anti-CD45-, Anti-CD11b- und biotinylierten Anti-CD4-Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation wurden die Pellets gewaschen und danach mit NeutrAvidin unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Dabei wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen Mengen des NeutrAvidins, nämlich 0,05 µg, 0,5 µg und 5 µl, getestet. Es erfolgten anschließend zwei Waschschrte mit MACS-Puffer und die Inkubation mit ^{Biotin.Cfl}-PFCE-PFCs beziehungsweise ^{Biotin.A488}-PFCE-PFCs bei 37 °C für 20 Minuten.

Für das Targeting von ^{Av.Biotin}-PFCs wurden die Zellen ebenfalls zunächst mit genannten Antikörpern inkubiert. Nach Waschen der Pellets folgte die Inkubation mit je 30 µl ^{Av.Biotin}-PFCs für 20 Minuten bei 37 °C. Entsprechend der angenommenen Integration des NeutrAvidins in die Lipidhülle der Emulsionen fand kein separater Inkubationsschritt mit diesem statt.

Auch in diesen Versuchen wurden die Zellpellets nach der finalen Inkubation gewaschen, in MACS-Puffer aufgenommen, mit DAPI gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die toten Zellen wurden mittels DAPI-Färbung (1 µl/ml) markiert und von der Analyse ausgeschlossen.

4. Ergebnisteil

4.1. Zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten PFCs

4.1.1. Herstellung und Charakterisierung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) hergestellt, um nachfolgend sowohl deren Aufnahme durch Immunzellen als auch die bildgebenden Eigenschaften dieser zu untersuchen. Zur Erzeugung der PFCs wurden die Perfluorkarbonate PFCH (Perfluor-1,3,5-trimethylcyclohexan) und PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) verwendet. Hierfür wurden diese mit dem Lipid E80S in Phosphat-Glycerol-Puffer dispergiert und während dieses Prozesses mit den Fluoreszenzfarbstoffen A488 oder A647 markiert. Nach Erzeugen einer Voremulsion wurde diese im Anschluss mittels Hochdruckhomogenisation bei 1000 Bar à fünf Zyklen prozessiert.

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung wurden hydrodynamischer Partikeldurchmesser, Polydispersitätsindex (PDI) und ζ -Potenzial der Emulsionen bestimmt. Abbildung 4A zeigt die Partikelgrößenverteilung der PFCs, welche erkennen lässt, dass sich ein großer Teil der Partikel in einem Größenbereich von 150 bis 250 nm befindet. Abbildung 4B zeigt die bei der DLS erhaltenen Messwerte. Die ^{A488}PFCH-PFCs weisen mit $196,4 \pm 1,8$ nm einen signifikant höheren Partikeldurchmesser auf als die ^{A488}PFCE-PFCs mit $153,6 \pm 2,3$ nm und die ^{A647}PFCE-PFCs mit $162,3 \pm 18,8$ nm. Für die ^{A647}PFCH-PFCs liegt der hydrodynamische Durchmesser bei $182,4 \pm 33,4$ nm. Das ζ -Potenzial beträgt für alle PFCs zwischen -30 mV und -40 mV. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den ^{A647}PFCE-PFCs mit einem ζ -Potenzial von $-32,9 \pm 1,4$ mV und den ^{A647}PFCH-PFCs mit dem niedrigsten Wert von $-36,4 \pm 3,4$. Alle PFCs zeigen mit einem PDI zwischen 0,07 und 0,1 eine nahezu monodisperse Verteilung.

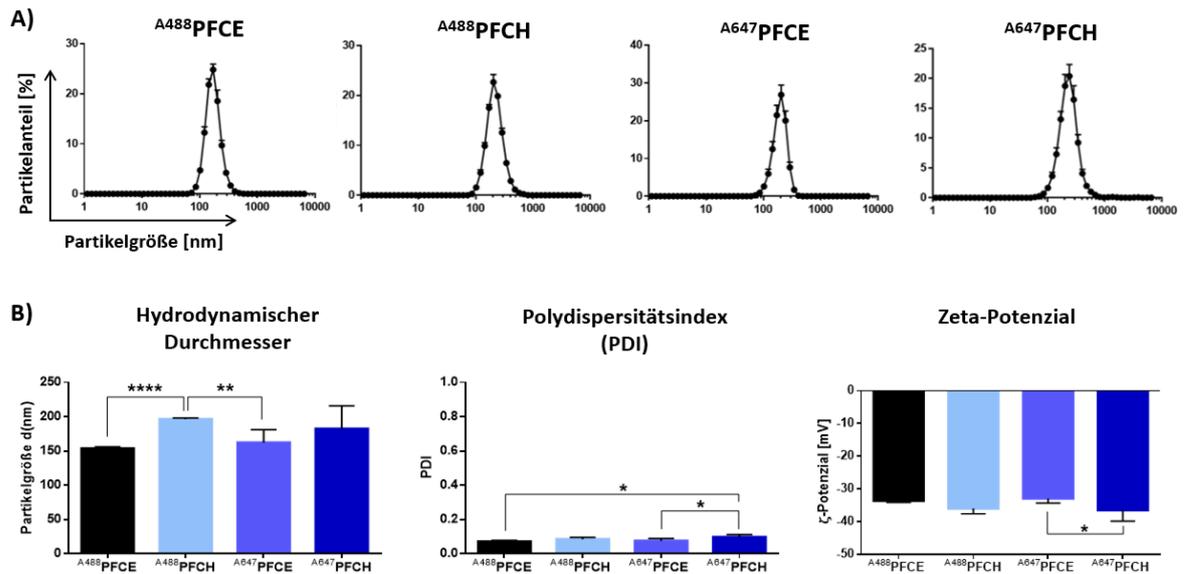


Abbildung 4: DLS-Messungen von A^{488} PFCE-, A^{488} PFCH-, A^{647} PFCE- und A^{647} PFCH-PFCs. A) Darstellung der Partikelgrößenverteilung. Auf der Ordinate aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Partikel, auf der Abszisse die Partikelgröße in nm. B) Darstellung der Ergebnisse für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (**links**), den Polydispersitätsindex (PDI) (**Mitte**) und das Zeta-Potenzial in mV (**rechts**). Mittelwerte \pm SD; n = 6. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$. Quelle: Eigene Darstellung

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse ist eine weitere Methode zur Untersuchung von Partikelgrößenverteilungen in flüssigen Medien. Zwar ist es mit dem verwendeten Gerät weder möglich den PDI noch das ζ -Potenzial zu bestimmen, dafür aber zusätzlich zur Partikelgröße die durchschnittliche Partikelkonzentration in Partikel/ml. Die Graphen für die Größenverteilung der PFCs sind in Abbildung 5A dargestellt. Die Ergebnisse der NTA-Messungen für die Partikelgröße und Partikelkonzentration sind Abbildung 5B zu entnehmen. Die höchste Partikelkonzentration/ml liegt bei den A^{488} PFCH-PFCs mit $4,338 \times 10^{13} \pm 1,268 \times 10^{13}$ Partikel/ml vor. Bei den A^{647} PFCH-PFCs ist sie mit $3,453 \times 10^{13} \pm 4,071 \times 10^{12}$ Partikel/ml am niedrigsten. Für die A^{647} PFCE-PFCs liegt sie bei $3,818 \times 10^{13} \pm 1,720 \times 10^{13}$ Partikel/ml und für die A^{488} PFCE-PFCs bei $4,073 \times 10^{13} \pm 1,005 \times 10^{13}$. Hier kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die A^{488} PFCH-PFCs stellen in der NTA mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $158,9 \pm 7,6$ die größten PFCs dar, gefolgt von den A^{647} PFCH-PFCs, bei denen der Wert $155,2 \pm 4,9$ nm beträgt. Im Vergleich zu den PFCH-PFCs ist dieser Parameter für die A^{488} PFCE- und die A^{647} PFCE-PFCs mit etwa 140 nm signifikant niedriger. Vergleicht man die hydrodynamischen Durchmesser der A^{488} PFCH-PFCs und A^{647} PFCH-PFCs sowie die der A^{488} PFCE-PFCs und A^{647} PFCE-PFCs, besteht kein signifikanter Unterschied.

Die Fluoreszenzeigenschaften der PFCs wurden mithilfe des *In-Vivo-Imaging-Systems IVIS Lumina II* analysiert. In Abbildung 6 sind die Fluoreszenzaufnahmen sowie die quantitative Auswertung der

Fluoreszenzsignale dargestellt. Emulsionen mit gleichem Farbstoff wurden simultan im Vergleich zu nicht-fluoreszierenden PFOB-PFCs gemessen (Abb. 6A). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der A^{647} PFCH-PFCs ist mit einem Wert von $4,04 \times 10^6 \pm 2,77 \times 10^5$ geringfügig höher als die MFI von $3,49 \times 10^6 \pm 1,95 \times 10^5$ der A^{647} PFCE-PFCs. Damit erreichen die mit Atto647 markierten PFCs ein 100-mal höheres und signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal als die Kontrollemulsion, deren MFI einen Wert von $3,88 \times 10^4 \pm 2,86 \times 10^4$ annimmt (Abb. 6B). Für die A^{488} PFCH-PFCs beträgt die MFI $7,60 \times 10^5 \pm 9,26 \times 10^4$ und für die A^{488} PFCE-PFCs $4,57 \times 10^5 \pm 3,27 \times 10^4$. Bei der Kontrollemulsion liegt sie hingegen bei $3,82 \times 10^4 \pm 2,94 \times 10^3$. Die MFI der A^{488} -PFCs liegen etwa 10- bis 20-mal und damit signifikant höher als die der Kontrollemulsion. Weiterhin fluoreszieren die A^{488} PFCH-PFCs etwa 1,6-mal stärker als die A^{488} PFCE-PFCs, was nicht nur quantitativ, sondern auch visuell erkennbar ist (Abb. 6A). Allerdings ist der Unterschied hier statistisch nicht signifikant.

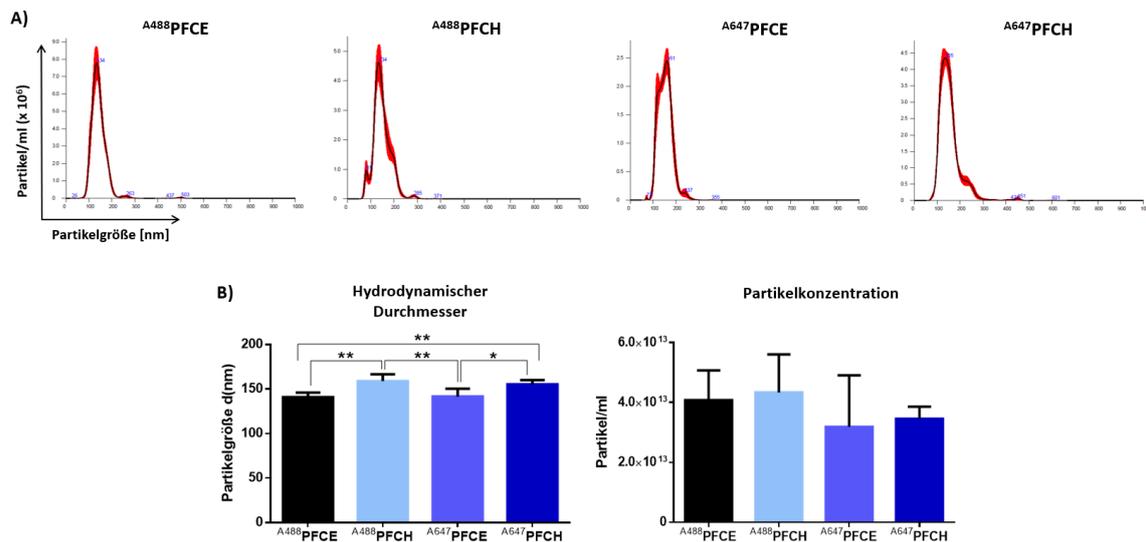


Abbildung 5: NTA-Messungen von A^{488} PFCE-, A^{488} PFCH-, A^{647} PFCE- und A^{647} PFCH-PFCs. **A)** Auf der Ordinate aufgetragen ist die Partikelkonzentration in Partikel/ml, auf der Abszisse die detektierte Partikelgröße in nm. **B)** Graphische Darstellung der Ergebnisse für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (**links**) und die Partikelkonzentration in Partikel/ml (**rechts**) Mittelwerte \pm SD; n = 6. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Quelle: Eigene Darstellung

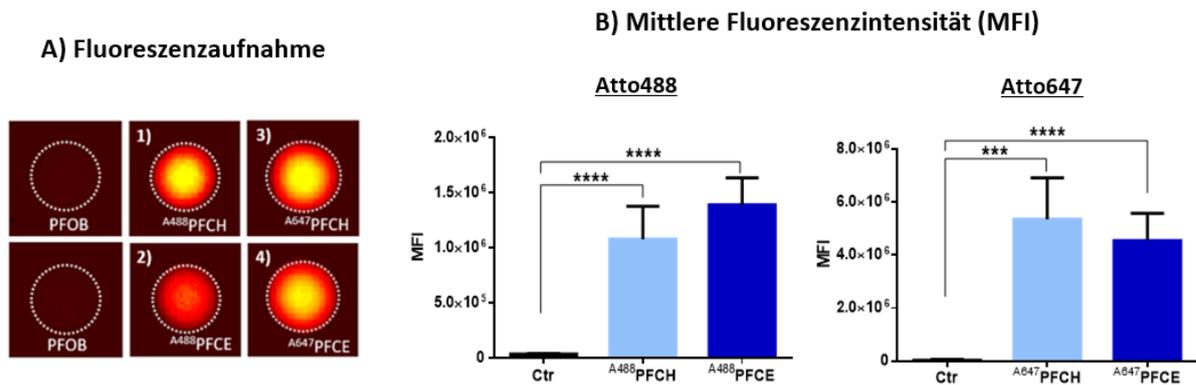


Abbildung 6: Fluoreszenzeigenschaften der hergestellten PFCs. **A)** Fluoreszenzaufnahme von PFCs ohne Fluoreszenzfarbstoff (PFOB; links) und von **1)** A^{488} PFCH-, **2)** A^{488} PFCE-, **3)** A^{647} PFCH- und **4)** A^{647} PFCE-PFCs. **B)** Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der Atto488-markierten PFCs (**links**) sowie der Atto647-markierten PFCs (**rechts**) gegenüber der nicht-fluoreszierenden Kontrolle (Ctr). Abgebildet sind Mittelwerte \pm SD; n = 6. *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$. Quelle: Eigene Darstellung

4.1.2. Zelluläre Aufnahme von PFCs durch humane Immunzellen

In diesem Versuchsteil sollte die passive zelluläre Aufnahme verschiedener PFCs durch humane Leukozyten, darunter Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen und B-Zellen, untersucht werden. Dazu wurden die Leukozyten mit vier verschiedenen PFCs, nämlich A^{488} PFCH-PFCs, A^{647} PFCH-PFCs, A^{488} PFCE-PFCs und A^{647} PFCE-PFCs, angesteuert. Verwendet wurden PFC-Konzentrationen von 5, 10 und 20 μ l sowie 5 μ l einer 1:10 Verdünnung. Die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen CD45, CD11b, CD3 und CD4 nach Inkubation mit den PFCs ermöglicht in der durchflusszytometrischen Analyse eine Differenzierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten ($CD11b^{(+)}$), B-Zellen ($CD3^{(-)}$ Lymphoide), $CD8^{(+)}$ T-Zellen ($CD3^{(+)}/CD4^{(-)}$) und $CD4^{(+)}$ T-Zellen ($CD3^{(+)}/CD4^{(+)}$). Das dabei verwendete Gating-Schema zur Abgrenzung der Populationen ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die in der durchflusszytometrischen Analyse erfasste zelluläre Aufnahme der verschiedenen PFCs durch oben genannte Zelltypen. Der rote Graph entspricht der PFC-Inkorporation durch eine bestimmte Zellpopulation, der graue Graph dem Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle. Weiterhin ist die quantitative Auswertung der zellulären Aufnahme dargestellt: Auf der Abszisse dargestellt ist die Konzentration der jeweiligen Perfluorkarbon-Emulsion in der Zellsuspension, auf der Ordinate das gemessene Fluoreszenzsignal, angegeben als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Das Hintergrundsignal wurde von jedem gemessenen Fluoreszenzsignal abgezogen.

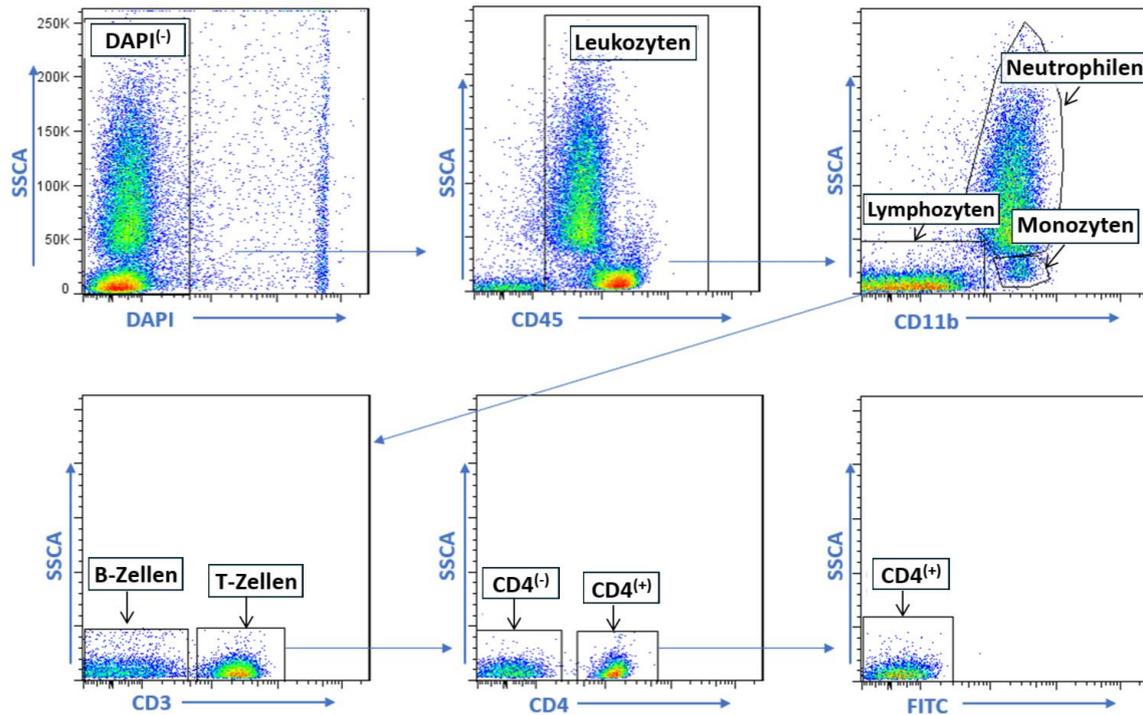


Abbildung 7: Gating-Schema. Durchflusszytometrische Analyse von humanen Leukozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen CD45, CD11b, CD3 und CD4 inkubiert worden sind. Detektierte Fluoreszenzsignale dienen der Differenzierung von Zellpopulationen (siehe Bildbeschriftung). Für jede Zellpopulation wurde außerdem die Partikelaufnahme abhängig vom verwendeten PFC mittels FITC oder APC bestimmt. Quelle: Eigene Darstellung

4.1.2.1. Analyse der zellulären Aufnahme von A^{488} PFCE- und A^{647} PFCE-PFCs

Betrachtet man die Histogramme der B-Zellen, Monozyten und Neutrophilen für die Aufnahme von A^{488} PFCE-PFCs, ist eine Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (Abb. 8A). Hervorstechend sind zudem die vergleichbar hohen Fluoreszenzsignale der B-Zellen und myeloiden Zellen. Beispielsweise liegt die MFI der B-Zellen nach Inkubation mit $20 \mu\text{l}$ A^{488} PFCE-PFCs bei $4,9 \times 10^2 \pm 3,3 \times 10^2$, die der Monozyten bei $5,7 \times 10^2 \pm 1,5 \times 10^2$ und der Neutrophilen bei $3,6 \times 10^2 \pm 2,3 \times 10^2$. Bei gleicher Konzentration beträgt diese für $CD4^{(+)}$ T-Zellen $9,1 \times 10^1 \pm 7,3 \times 10^1$ und für $CD8^{(+)}$ T-Zellen lediglich $1,4 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$ (Abb. 8B). Damit zeigen die B-Zellen hier eine höhere Aufnahme als die Neutrophilen und bei den übrigen verwendeten PFC-Konzentrationen eine mit diesen vergleichbar hohe Aufnahme. Die myeloiden Zellen und B-Lymphozyten haben etwa 4- bis 6-mal stärkere Fluoreszenzsignale als die $CD4^{(+)}$ T-Zellen, was für eine deutlich höhere PFC-Aufnahme durch diese Zellen spricht und den beschriebenen Rechtsshift in den Histogrammen erklärt.

Betrachtet man die Aufnahme der A^{647} PFCE-PFCs, ist eine deutlich höhere Partikelinkorporation durch die Monozyten und Neutrophilen im Gegensatz zu lymphoiden Zellen, veranschaulicht durch

die Rechtsverschiebung der Kurve in den Histogrammen, erkennbar (Abb. 8C). Die MFI der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen liegt bei einer Konzentration von 30 μ l bei $3,9 \times 10^1 \pm 3,4 \times 10^1$ und unterscheidet sich nicht erheblich von den Fluoreszenzsignalen, die die B-Zellen bei gleichen PFC-Konzentrationen zeigen (Abb. 8D). Die myeloiden Zellen nehmen unter Verwendung derselben Emulsion deutlich mehr Partikel auf als die Lymphoiden. Die MFI liegt hier nach Inkubation mit 20 μ l A⁶⁴⁷PFCE-PFC zwischen $3,9 \times 10^2$ und 1×10^3 .

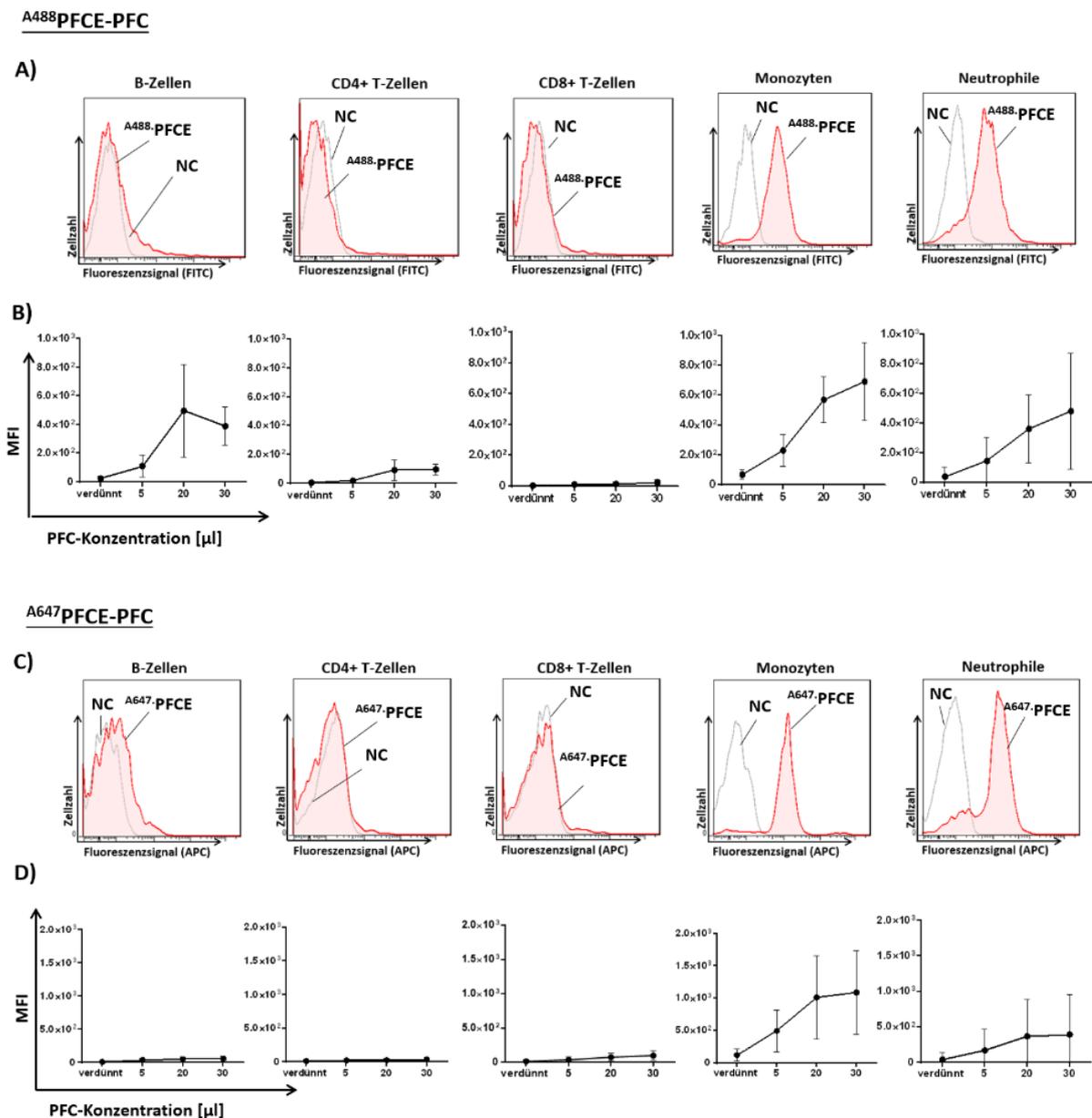


Abbildung 8: Analyse der zellulären Aufnahme von A⁴⁸⁸PFCE-PFC und A⁶⁴⁷PFCE-PFC durch humane Immunzellen. Histogramme zur Aufnahme von je 20 μ l A⁴⁸⁸PFCE-PFC (**A**) bzw. A⁶⁴⁷PFCE-PFC (**C**). Die graue Kurve stellt das Signal der Negativkontrolle (NC) dar. Quantifizierung der Aufnahme von A⁴⁸⁸PFCE-PFC (**B**) und von

^{A647}PFCE-PFC (**D**) in verschiedenen Konzentrationen (verdünnt, 5 μ l, 20 μ l, 30 μ l) durch B-Zellen, CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, CD8⁽⁺⁾ T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen. Mittelwerte + SD; n = 6 – 10. Quelle: Eigene Darstellung

4.1.2.2. Analyse der zellulären Aufnahme von ^{A488}PFCH- und ^{A647}PFCH-PFCs

In Abbildung 9 sind die Histogramme und die Quantifizierung der PFC-Aufnahme durch die Zellpopulationen nach Inkubation mit den ^{A488}PFCH-PFCs und ^{A647}PFCH-PFCs dargestellt. Unter den Lymphozyten zeigen die B-Zellen und die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen eine ähnlich hohe Aufnahme der ^{A488}PFCH-PFCs (Abb. 9B). Die Fluoreszenzsignale bewegen sich dabei um Werte von etwa 2×10^2 bis 1×10^3 MFI. Die geringste Aufnahme zeigen die CD8⁽⁺⁾ T-Zellen mit einer maximalen MFI von etwa 2×10^2 .

In Bezug auf das Aufnahmeverhalten für die ^{A647}PFCH-PFCs ist keine klare Abgrenzung der Zellpopulationen möglich, da weder für die CD3⁽⁻⁾ noch für die CD3⁽⁺⁾ Zellen ein eindeutiges Signal zu sehen ist. Vergleicht man die *Dot Plots* vor und nach Anwendung des PFCs (Abb. 9E), so sind vor Inkubation mit ^{A647}PFCH-PFCs die B-Zellen, CD8⁽⁺⁾ T-Zellen und CD4⁽⁺⁾ T-Zellen klar voneinander unterscheidbar. Nach der Inkubation sind einzig die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen von den anderen Populationen zu trennen. Aufgrunddessen, dass sich unter den CD3⁽⁺⁾/CD4⁽⁻⁾ Zellen sowohl B-Zellen als auch CD8⁽⁺⁾ Zellen befinden könnten, kann keine zuverlässige Aussage über das PFC-Aufnahmeverhalten für die B-Zellen, CD3⁽⁺⁾ Zellen und CD8⁽⁺⁾ T-Zellen gemacht werden. Die Auswertung der zellulären Aufnahme ist hier somit nur für die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen möglich (Abb. 9D). Im Vergleich zu den anderen Emulsionen werden die ^{A647}PFCH-PFCs von allen Zellpopulationen gut aufgenommen, was ebenfalls in den Histogrammen zu sehen ist (Abb. 9C). Bereits nach Inkubation mit der verdünnten Emulsion ist eine deutliche Aufnahme zu sehen. Interessant ist hier die deutlich geringere Aufnahme durch die Monozyten im Vergleich zu den CD4⁽⁺⁾ T-Zellen und den Neutrophilen. Insgesamt unterliegt die Aufnahme hohen Schwankungen.

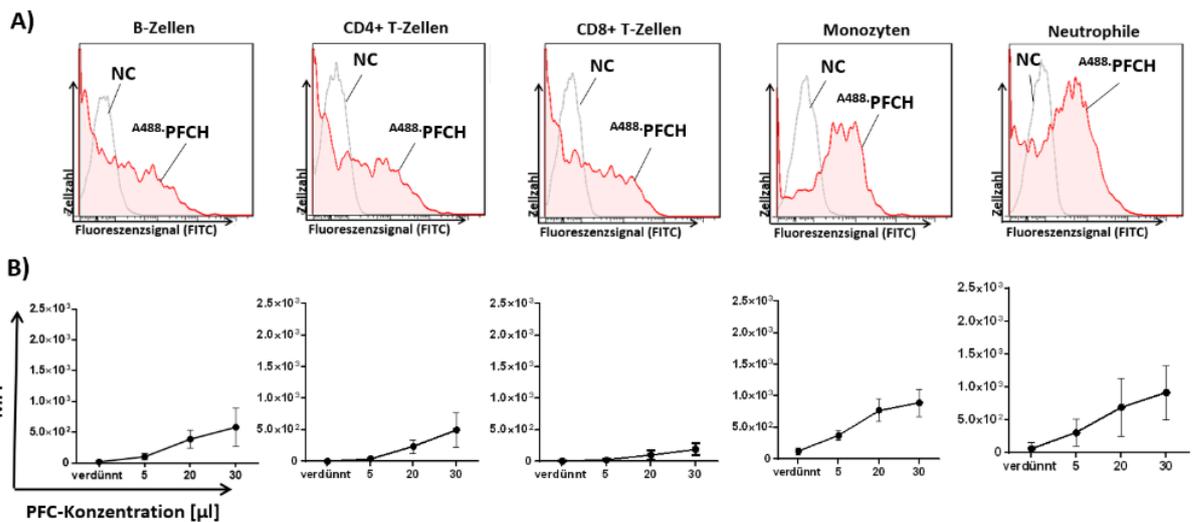
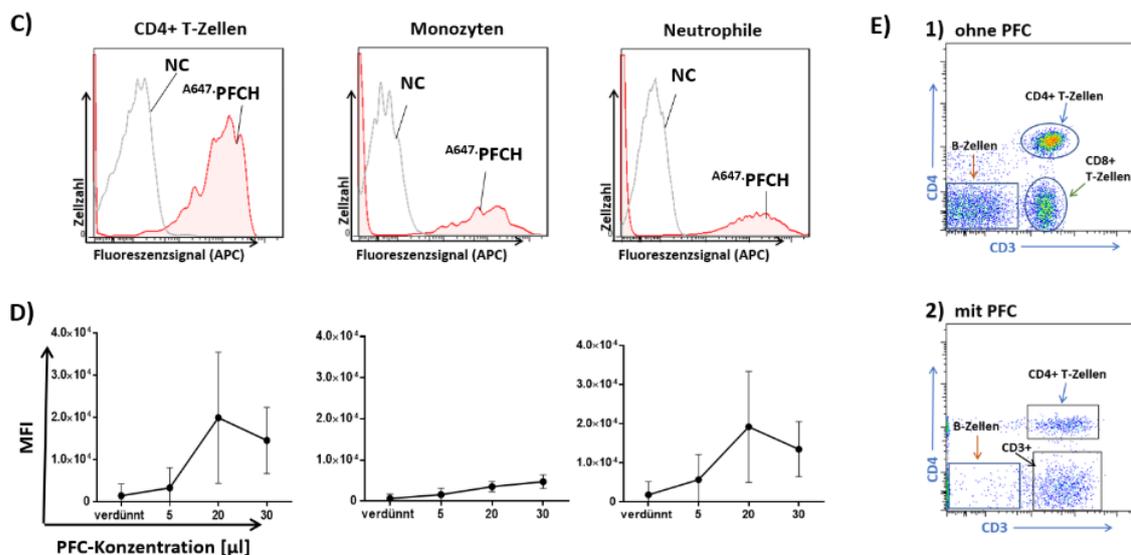
A488PFCH-PFC**A647PFCH-PFC**

Abbildung 9: Analyse der zellulären Aufnahme von A^{488} PFCH-PFC und A^{647} PFCH-PFC durch humane Immuzellen. Histogramme zur Aufnahme von je 20 μl A^{488} PFCH-PFC (**A**) und A^{647} PFCH-PFC (**C**). Die graue Kurve stellt das Signal der Negativkontrolle dar. Quantifizierung der Aufnahme von A^{488} PFCH-PFC (**B**) und A^{647} PFCH-PFC (**D**) in verschiedenen Konzentrationen (in μl) durch B-Zellen, CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, CD8⁽⁺⁾ T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen. **E**) Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von A^{647} PFCH-PFC durch humane Immuzellen. Dot Plots von lymphoiden Zellen, die **1**) nicht mit PFCs behandelt worden sind und **2**) nach Inkubation mit A^{647} PFCH-PFC. CD4⁽⁺⁾ T-Zellen werden als CD3⁽⁺⁾/CD4⁽⁺⁾ identifiziert, CD8⁽⁺⁾ T-Zellen als CD3⁽⁺⁾/CD4⁽⁻⁾. Die CD3⁽⁻⁾/CD4⁽⁻⁾ Zellen werden als B-Zellen identifiziert. Mittelwerte \pm SD; n = 6 – 10. Quelle: Eigene Darstellung

4.2. Zelluläre Aufnahme von PEGylierten PFCs

4.2.1. Herstellung und Charakterisierung von PEG-^{A488}PFCs und PEG-^{A647}PFCE-PFCs

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen, in deren Lipidschicht Polyethylenglykol verankert ist. Die Fragestellung war, welchen Einfluss die PEGylierung auf die Eigenschaften der PFCs und deren Aufnahme durch Leukozyten hat. Um diese Funktionalisierung umzusetzen, wurden die für das passive Targeting genutzten ^{A488}- und ^{A647}PFCE-PFCs mittels Sterol-basierter Post-Insertions-Technik mit Cholesterin-PEG₂₀₀₀ funktionalisiert. Dazu wurden zunächst Emulsionen mit Cholesterin-PEG-Anteilen im Bereich von 5 mol% bis 20 mol% hergestellt, um die Auswirkungen einer Erhöhung der Chol-PEG-Menge auf die zelluläre Aufnahme zu untersuchen.

Auch die PEGylierten PFCs wurden mithilfe der DLS und NTA analysiert. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse aus den Messungen für die PEGylierten ^{A647}- und ^{A488}PFCE-PFCs dargestellt. Feststellbar ist, dass in der DLS der hydrodynamische Durchmesser der ^{A488}PFCE-PFCs mit einem höheren PEG-Anteil steigt. So haben die 0 mol% PEG-^{A488}PFCE-PFCs mit 157,6±0,8 nm verglichen mit den anderen ^{A488}PFCs einen statistisch signifikant kleineren Partikeldurchmesser (Abb. 7A). Der hydrodynamische Durchmesser der 5 mol% PEG-^{A488}PFCE-PFCs (161±1,3 nm) ist kleiner als der der 20 mol% (165,1±1,7 nm). Für die 10 mol% PEG-^{A488}PFCs liegt der Wert bei 163,6±0,8. Entgegen der Erwartung, dass in der NTA ähnlich wie in der DLS die Partikelgröße mit dem Grad der PEGylierung zunimmt, zeigt sich bei den A488-markierten PFCs eine kontinuierlich mit dem PEG-Anteil abnehmende Partikelgröße (Abb. 10C). Der hydrodynamische Durchmesser der ^{A488}PFCs beträgt für die nicht PEGylierten PFCs mit 160,2±8,1 nm den höchsten Wert und nimmt bei den 5 mol% PEG-PFCs 152,3±7,8 nm und den 10 mol% PEG-PFCs 143±4,3 nm an. Bei den 20 mol% PEG-PFCs beträgt dieser Wert 142,6±5,5 nm, was somit im Vergleich der Niedrigste ist. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen der Partikelgröße der 0 mol% und der 20 mol% PFCs (Abb. 10C).

Auch bei den PEGylierten ^{A647}PFCE-PFCs ist in der DLS eine Größenzunahme mit steigendem PEG-Anteil zu beobachten (Abb. 10B). Hier weisen ebenfalls PFCs ohne Cholesterin-PEG mit 160,9±1,5 nm den niedrigsten Durchmesser auf, während die 5-, 10- und 20 mol% PEG-PFCs eine Größe zwischen 167 und 169 nm aufweisen. NTA-Messungen liefern vergleichbare Ergebnisse, denn hier sind ebenfalls die 0 mol% PFCs mit einer Größe von 146,4±6,6 nm signifikant größer als die 5- und die 20 mol% PFCs mit einer Größe von etwa 134 nm (Abb. 10D). Für die 10 mol% PEG-^{A647}PFCE-PFCs kann ein Durchmesser von 136,8±2,9 nm gemessen werden. Ein Zusammenhang dieser Größenabnahme mit dem PEG-Anteil ist bei den A647-markierten PFCs jedoch nicht erkenntlich,

obwohl hier ebenfalls die Größe der PEGylierten Partikel kleiner ausfällt als bei den nicht-PEGylierten.

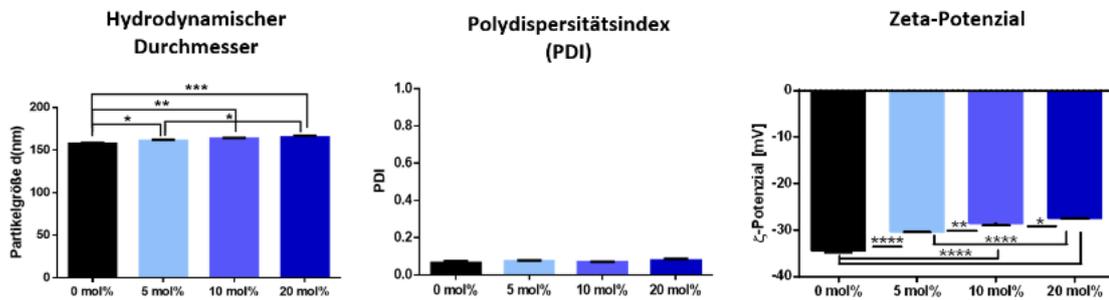
Über die Partikelgröße hinaus wurde das ζ -Potenzial ermittelt. Dieses beträgt für alle PFCs Werte zwischen circa -35 mV und -25 mV. Auffällig ist hier, dass das ζ -Potenzial mit steigendem PEG-Gehalt positiver wird. Für die nicht PEGylierten ^{A488}PFCE-PFCs beträgt es $-34,01 \pm 0,1$ mV, für die 5 mol% PFCs $-30,3 \pm 0,2$ mV, für die 10 mol% PFCs liegt es bei $-28,5 \pm 0,5$ mV und für die 20 mol% PFCs bei $-27,4 \pm 0,2$ mV. Dabei unterscheidet sich jede Nanoemulsion in diesem Aspekt signifikant von allen übrigen A488-markierten Emulsionen. Ähnliche Werte zeigen sich bei den Atto647-markierten PFCs. Hier liegt das ζ -Potenzial für die nicht PEGylierte Emulsion bei $-34,8 \pm 0,9$ mV und für die 5 mol% PEG-^{A647}PFCE-PFCs bei $-30,2 \pm 0,6$ mV. Mit einem signifikanten Unterschied ist das ζ -Potenzial bei den 20 mol% PEG-PFCs ($-26,9 \pm 1$ mV) positiver. Bei einem PEG-Gehalt von 10 mol% nimmt dieses einen Wert von $-29,3 \pm 0,6$ mV an. Für die 0 mol% PFCs ist das ζ -Potenzial dementsprechend negativer als bei den PEGylierten Emulsionen. Der PDI liegt für alle hier untersuchten PFCs zwischen $0,07 \pm 0,01$ und $0,08 \pm 0,01$.

^{A488}PFCE-PFCs und ^{A647}PFCE-PFCs weisen vergleichbare Partikelkonzentrationen pro Milliliter auf, die im Bereich von $3,5 \times 10^{12}$ bis $4,8 \times 10^{12}$ schwanken (Abb. 10C/D). Mit $2,6 \times 10^{12} \pm 5,2 \times 10^{11}$ Partikeln/ml ist die 0 mol% PEG-^{A647}PFCE-Emulsion die Emulsion mit der geringsten Partikelanzahl und unterscheidet sich signifikant von PEGylierten ^{A647}PFCs. Die 10 mol% PEG-^{A647}PFCE-Emulsion hat mit $4,733 \times 10^{12} \pm 6,264 \times 10^{11}$ Partikeln/ml die höchste Partikelkonzentration.

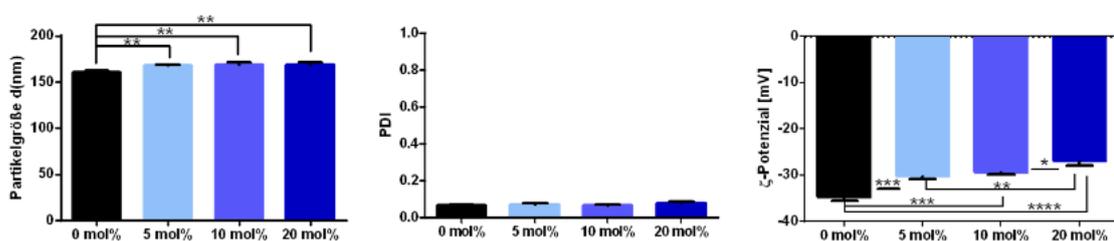
Mit dem *In-Vivo-Imaging-System IVIS Lumina II* konnten außerdem die Fluoreszenzeigenschaften der PFCs untersucht werden. In Abbildung 11 sind die Fluoreszenzaufnahmen sowie die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale der ^{A488}PFCE-PFCs und ^{A647}PFCE-PFCs dargestellt. PFCs mit gleichem Fluoreszenzmarker wurden simultan gemessen und mit einer PFOB-basierten Kontrollemulsion, welche keinen Fluoreszenzfarbstoff enthält, verglichen. Mit einer MFI von $1,78 \times 10^6 \pm 1,24 \times 10^5$ bei den 0 mol% beziehungsweise $1,74 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^5$ bei den 10 mol% ^{A647}PFCE-PFCs sind deren Signale etwa 1,15-mal stärker als die der 5 mol%- und der 20 mol% PEG-^{A647}PFCE-PFCs. Die A647-markierten PFCs fluoreszieren etwa 60-mal stärker als die Kontrolle (Abb. 11A). Bei den ^{A488}PFCE-PFCs liegt eine circa 8-mal stärkere Fluoreszenz vor als bei der Kontrolle, deren MFI einen Wert von $2,78 \times 10^4 \pm 7,13 \times 10^3$ aufweist. Mit einer MFI von $2,42 \times 10^5 \pm 3,33 \times 10^2$ zeigen die 0 mol% PEG-PFCs die höchste und die 10 mol% sowie 20 mol% mit einer MFI von etwa 2×10^5 die niedrigsten Signalstärken (Abb. 11B, links). Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Fluoreszenzsignale der PFCs unabhängig von dem verwendeten Fluoreszenzmarker stets signifikant stärker sind als die der Kontrollemulsion.

DLS-Messung

A) A488-PFCs

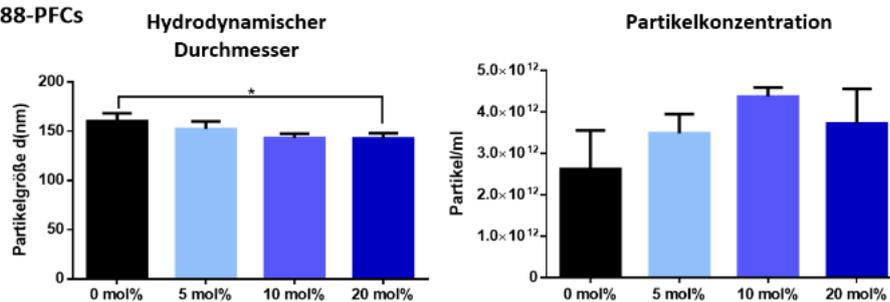


B) A647-PFCs



NTA-Messung

C) A488-PFCs



D) A647-PFCs

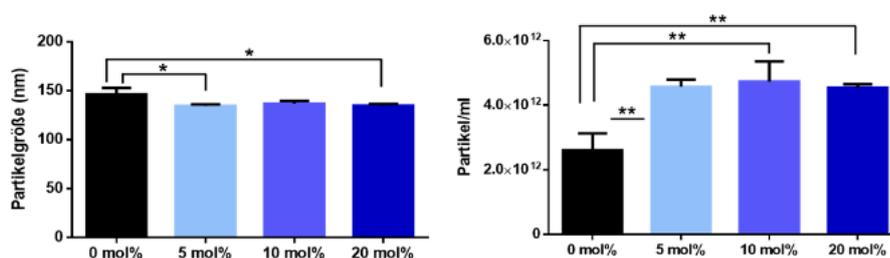


Abbildung 10: DLS- und NTA-Messungen PEGylierter PFCs. Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der DLS-Messung für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (**links**), den Polydispersitätsindex (PDI) (**Mitte**) und das Zeta-Potenzial in mV (**rechts**) der **A) PEG-A⁶⁴⁷PFCE-PFCs** und **B) PEG-A⁴⁸⁸PFCE-PFCs**. Darstellung der Ergebnisse aus der NTA für die durchschnittliche Partikelgröße in d(nm) (**links**) und die Partikelkonzentration in Partikel/ml (**rechts**) der **C) PEG-A⁶⁴⁷PFCE-PFCs** und **D) der PEG-A⁴⁸⁸PFCE-PFCs**. Der Anteil des Cholesterin-PEG am Gesamtlipidgehalt der PFCs ist in mol% angegeben (0-, 5-, 10- und 20 mol%). Mittelwerte \pm SD; n = 3. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$. Quelle: Eigene Darstellung

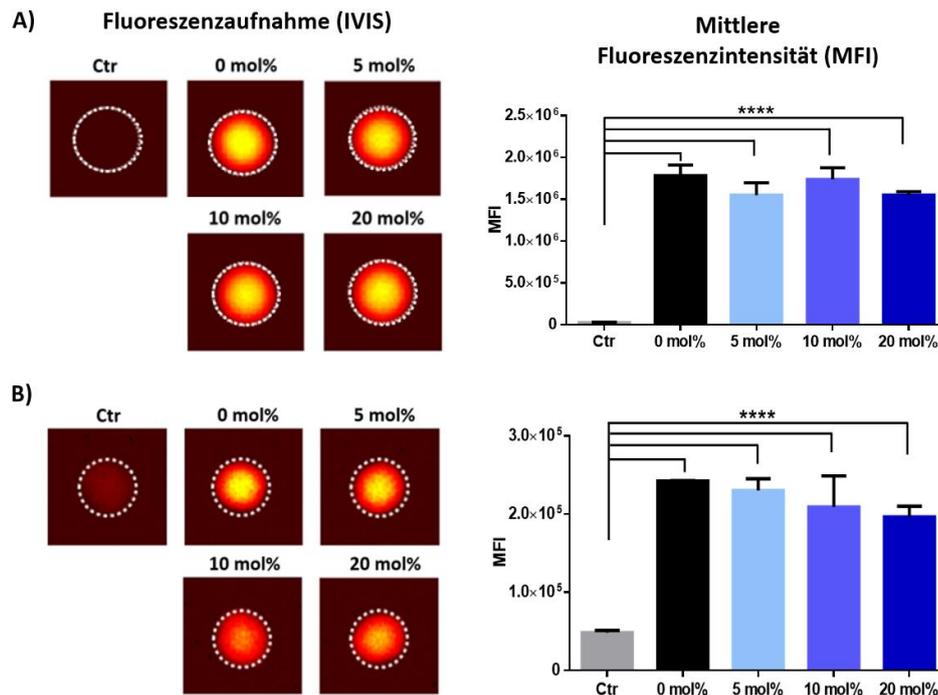


Abbildung 11: Messung der Fluoreszenzsignale PEGylierter PFCs. Fluoreszenzaufnahme (**links**) und quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale (**rechts**) der **A)** PEG-^{A647}PFCE-PFCs und **B)** der PEG-^{A488}PFCE-PFCs. Nicht-fluoreszierende PFOB-PFCs wurden als Kontrollemulsion (**Ctrl, links**) verwendet. Der Anteil des Cholesterin-PEG am Gesamtlipidgehalt der PFCs ist in mol% angegeben (0, 5, 10 und 20 mol%). Die quantitative Auswertung der Signale ist angegeben als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der PFCs. Mittelwerte ± SD; n = 3. **** = p<0,0001. Quelle: Eigene Darstellung

4.2.2. Analyse der zellulären Aufnahme von PEG-PFCs durch humane Immunzellen

Ziel des nächsten Versuches war die Untersuchung des Einflusses der PEG-Menge auf die zelluläre Aufnahme der PFCs. Das Einbringen von Polyethylenglykol in die Lipidschicht der PFCs soll eine Reduzierung der Opsonierung und somit eine verminderte Aufnahme der PFCs durch phagozytisch aktive Zellen bewirken.

Im Folgenden wird die zelluläre Aufnahme von ^{A647}- und ^{A488}PFCE-PFCs mit unterschiedlichem PEG-Anteil (0-, 5-, 10- und 20 mol%) durch Monozyten, neutrophile Granulozyten, T- und B-Zellen verglichen (Abb. 12). Vor allem bei Monozyten ist eine sinkende mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit steigendem PEG-Anteil zu sehen: Die Inklusion von 20 mol% PEG bewirkt eine Reduzierung der zellulären Aufnahme von ^{A647}PFCs durch Monozyten um etwa 85 % und von ^{A488}PFCs um etwa 80 %. Die Aufnahme von ^{A647}PFCs durch neutrophile Granulozyten wird bei einer PEGylierung von 20 mol% um etwa 60 %, die von ^{A488}PFCs um etwa 75 % gesenkt (Abb. 12A). Visuell zeigt sich dies an dem Linksshift der blauen Kurve in den Histogrammen. Im Vergleich zur roten Kurve, welche die Aufnahme von nicht-PEGylierten PFCs zeigt, ist dabei ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal

der myeloiden Zellen detektierbar. Auffällig ist, dass die MFI der Neutrophilen erst nach Inkubation mit 20 mol% PEG-PFCs auf den niedrigsten Wert abfällt. Auch die Aufnahme durch Lymphozyten wird im Rahmen der PEGylierung reduziert. Vor allem bei der Partikelinkorporation von ^{A647}PFCE-PFCs durch B-Lymphozyten, die ebenfalls phagozytisch aktiv sind, wird dies ersichtlich: Hierbei sinkt die MFI nach Inkubation mit PEG-PFCs, verglichen mit der MFI nach Inkubation mit PFCs ohne PEG-Anteil, um etwa 94 % (Abb. 12B). Diese Beobachtung scheint jedoch nicht auf die PEG-^{A488}PFCs übertragbar zu sein. In diesem Fall steigt die Aufnahme der B-Zellen bei einem PEG-Anteil von 5 mol%, um anschließend bei einem PEG-Anteil von 10 und 20 mol% wieder zu sinken (Abb. 12A). Eine Senkung der MFI um 50 bis 70 % bei Verwendung von 20 mol% PEG-PFCs ist ebenfalls bei den T-Lymphozyten feststellbar. Folglich lässt sich sagen, dass ein PEG-Anteil von 20 mol% für alle analysierten Zelltypen eindeutig zur effektivsten Reduzierung der zellulären Aufnahme führt.

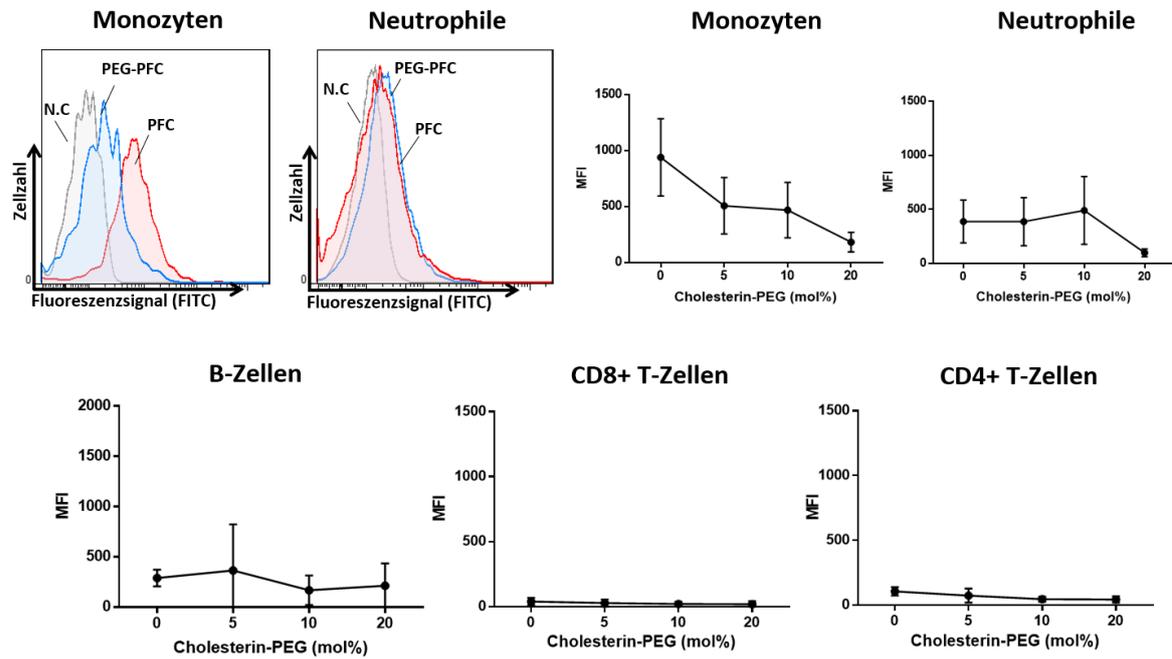
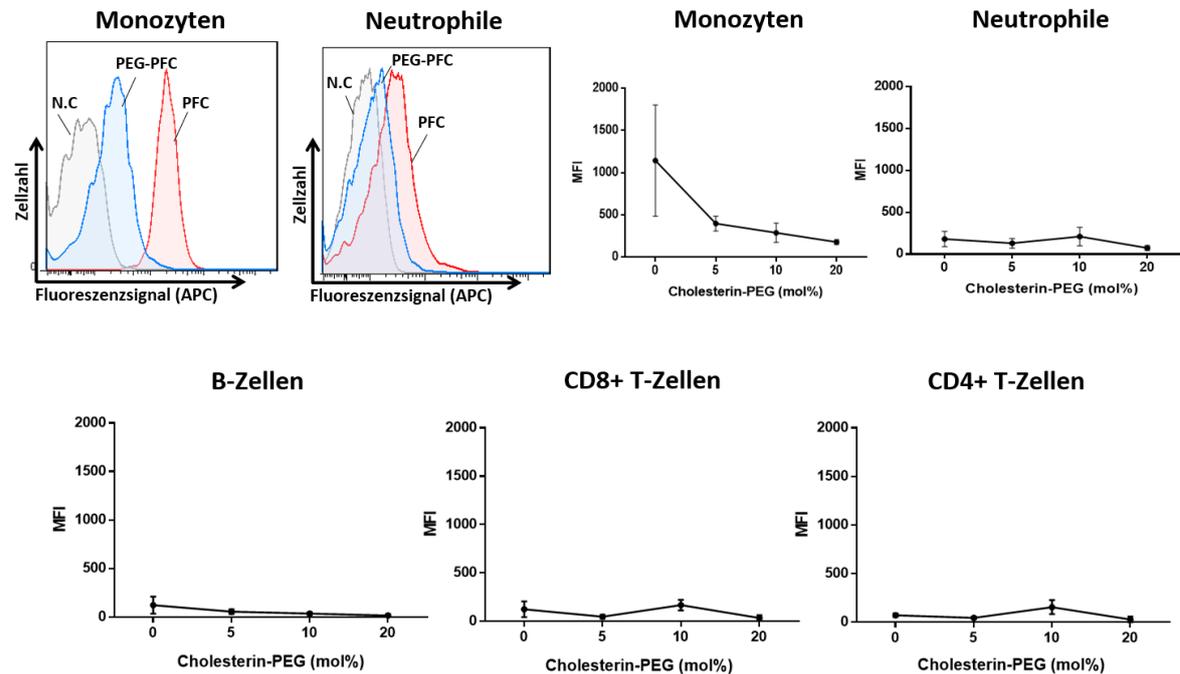
A) Aufnahme von PEG-A⁴⁸⁸PFCsB) Aufnahme von PEG-A⁶⁴⁷PFCs

Abbildung 12: Aufnahme PEGylierter A⁴⁸⁸PFCE-PFCs und A⁶⁴⁷PFCE-PFCs. Oben) Histogramme und quantitative Auswertung der Aufnahme von **A)** A⁴⁸⁸PFCE-PFCs (**rot**) im Vergleich zu PEGylierten PFCs (**blau**) und von **B)** A⁶⁴⁷PFCE-PFCs im Vergleich zu PEGylierten PFCs durch Monozyten und Neutrophilen. Die graue Kurve stellt das Signal der Negativkontrolle (N.C) dar, welche nicht mit PFCs inkubiert worden ist. **Unten)** Quantifizierung der zellulären Aufnahme von **A)** PEG-A⁴⁸⁸PFCE-PFCs bzw. **B)** A⁶⁴⁷PFCE-PFCs durch Lymphozyten (B-Zellen, CD8⁽⁺⁾ T-Zellen, CD4⁽⁺⁾ T-Zellen). Leukozyten wurden mit Antikörpern gegen CD45 (CD45-PerCp), CD11b (CD11b-PE/Cy7), CD3 (CD3-APC/Cy7) und CD4 (CD4-PE) gefärbt und anschließend bei 37 °C für 20 Minuten mit PFCs inkubiert, welche unterschiedliche Anteile des Cholesterin-PEG₂₀₀₀ (angegeben in mol%) aufweisen. Mittelwerte ± SD; n = 5. Quelle: Eigene Darstellung

4.2.3. Einfluss der PEGylierung von PFCs auf die Zellviabilität

Neben der zellulären Aufnahme sollte zusätzlich untersucht werden, ob die PEGylierung einen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Dazu wurde für jeden Versuch der Anteil der DAPI-positiven (DAPI⁽⁺⁾) Zellen bestimmt. Aufgrund der gestörten Membranfunktion toter Zellen kann der Fluoreszenzmarker (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) in diese eindringen und die Zellkerne färben. Abbildung 13 zeigt den prozentualen Anteil der toten Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit PFCs ohne PEG-Anteil sowie PEGylierten PFCs. Nach Inkubation der Zellen mit 5 mol% PEG-PFCs steigt der Anteil der DAPI⁽⁺⁾ Zellen um den Faktor 1,3 bis 1,5, bei der Verwendung von PFCs mit einem PEG-Anteil von 10 mol% um den Faktor 1,5 - 1,7. Im Vergleich dazu beträgt der Anteil verstorbenen Zellen nach Inkubation mit nicht-PEGylierten PFCs $9,2 \pm 3,5\%$ (^{A488}PFCs) beziehungsweise $9,7 \pm 3,4\%$ (^{A647}PFCs). Die stärkste Abnahme der Zellvitalität ist nach Inkubation der Leukozyten mit 20 mol% A488- und A647-markierten PEG-PFCs zu beobachten, welche eine circa 3-fache und signifikante Erhöhung der Zellmortalität verursachen. Unabhängig von der PEGylierung bewirkt bereits die Inkubation der Zellen mit nichtfunktionalisierten PFCs (0 mol% PEG) eine geringfügige aber nicht signifikante Zunahme toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die kein PFC erhielt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine mit steigendem PEG-Anteil kontinuierliche Einschränkung der Zellviabilität. Es gibt diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen der Verwendung von PEGylierten ^{A488}- und ^{A647}PFCE-PFCs. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass auch ohne den Einfluss von PFCs circa 10 % aller Zellen während der Versuchsschritte sterben.

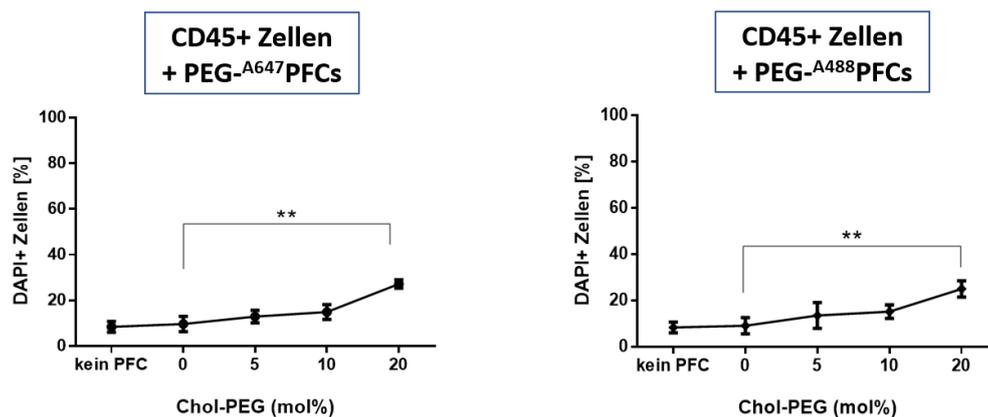


Abbildung 13: Zellvitalität humaner Leukozyten nach Inkubation mit PEGylierten ^{A647}- und ^{A488}PFCE-PFCs. Leukozyten aus humanem Blut wurden bei 37 °C für 20 Minuten mit PEGylierten PFCs inkubiert. Verglichen wurde der Einfluss unterschiedlicher Anteile des Cholesterin-PEG₂₀₀₀ (angegeben in mol%) der PFCs auf die Zellvitalität. Ein Ansatz wurde ohne PFCs inkubiert und diente als Referenzwert. Anschließend wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. DAPI⁽⁺⁾ Zellen, welche die toten Zellen repräsentieren, wurden durchflusszytometrisch ermittelt und quantifiziert. Mittelwerte \pm SD; n = 5. ** = $p < 0,01$. Quelle: Eigene Darstellung

4.3. Funktionalitätstest biotinylierter CD4-Antikörper

Im nächsten Schritt sollte in Vorbereitung auf das aktive Targeting mit Biotin.PFCs die Funktionalität der biotinylierten CD4-Antikörper geprüft werden. Dazu wurden humane Leukozyten mit CD45-, CD11b- und biotinylierten CD4-Antikörpern inkubiert, bevor eine weitere Inkubation mit Streptavidin-FITC folgte. Abbildung 14A zeigt in der oberen Reihe die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für deren Versuchsansatz nach Inkubation mit CD45- und CD11b-Antikörpern und FITC-Streptavidin und in der unteren Reihe nach zusätzlicher Inkubation mit biotinyliertem CD4-Antikörper und Streptavidin-FITC. Unter den lymphoiden Zellen werden CD4⁽⁺⁾ T-Zellen anhand der Markierung mit Streptavidin-FITC identifiziert und das Fluoreszenzsignal der Population als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. In Abbildung 14B sind die gemittelten MFI-Daten für die Zellen, die ohne (- mAb) beziehungsweise mit (+ mAb) biotinyliertem CD4⁽⁺⁾ Antikörper inkubiert worden sind, dargestellt. Unter simultaner Applikation des Antikörpers und des Streptavidins ist im FITC-Kanal der durchflusszytometrischen Analyse eine klare Zellpopulation abgrenzbar, die als Population der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen gewertet werden kann. Wie erwartet kann für die Negativkontrolle keine Bindung des Streptavidins ausgemacht werden. Mit einer MFI von 496±79,2 kann für die CD4⁽⁺⁾ Population der + mAb-Zellen ein etwa 25-mal höheres und damit signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal als bei der Kontrolle (MFI: 21,5±8,7) gemessen werden.

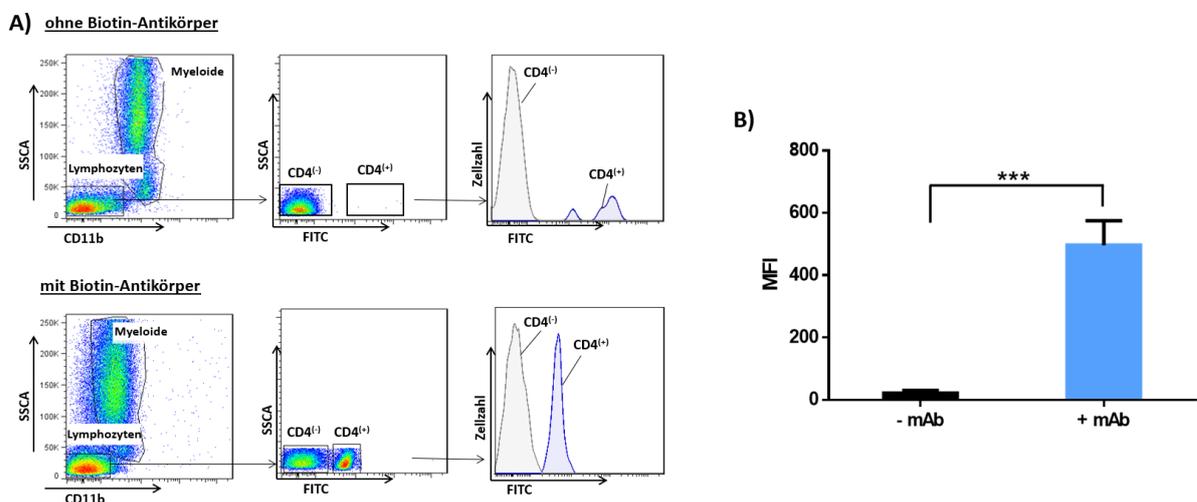


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse humaner Leukozyten. A) FITC-Signal der Lymphozyten nach Inkubation mit CD45- und CD11b-Antikörpern und FITC-Streptavidin (**oben**) und nach zusätzlicher Inkubation mit biotinyliertem CD4-Antikörper und Streptavidin-FITC (**unten**). Darstellung des Fluoreszenzsignals der erfassten CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im Histogramm (**rechts**). **B)** Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im FITC-Kanal nach Inkubation mit Streptavidin ohne biotinylierten Antikörper (**- mAb**) und mit Streptavidin plus biotinylierte CD4 Antikörper (**+ mAb**). Mittelwerte ± SD; n = 5. Quelle: Eigene Darstellung

4.4. Die Biotin-Avidin-Interaktion für die aktive Ansteuerung von T-Zellen

Der Fokus des nächsten Versuchsteils liegt auf dem Aufbau eines aktiven Targetings von $CD4^{(+)}$ T-Zellen unter Einsatz der Biotin-Avidin-Interaktion. Wie bereits in 1.5.3. beschrieben, ist sie die stärkste bekannte nichtkovalente Wechselwirkung zwischen einem Protein und einem Liganden und wird durch extreme pH-Werte, Temperaturen, organische Lösungsmittel und andere Denaturierungsmittel nicht beeinträchtigt.³⁻⁵ In der hier vorliegenden Arbeit wurde das deglykolisierte NeutrAvidin verwendet. Unter Anwendung biotinylierter $CD4$ -Antikörper, NeutrAvidin und biotinylierten PFCs soll, wie unten dargestellt, eine Biotin-Avidin-Brücke *in vitro* hergestellt werden. Auf diese Weise erfolgt eine spezifische Bindung der PFCs über NeutrAvidin an die Zelloberfläche der $CD4^{(+)}$ T-Zellen (Abb. 15).

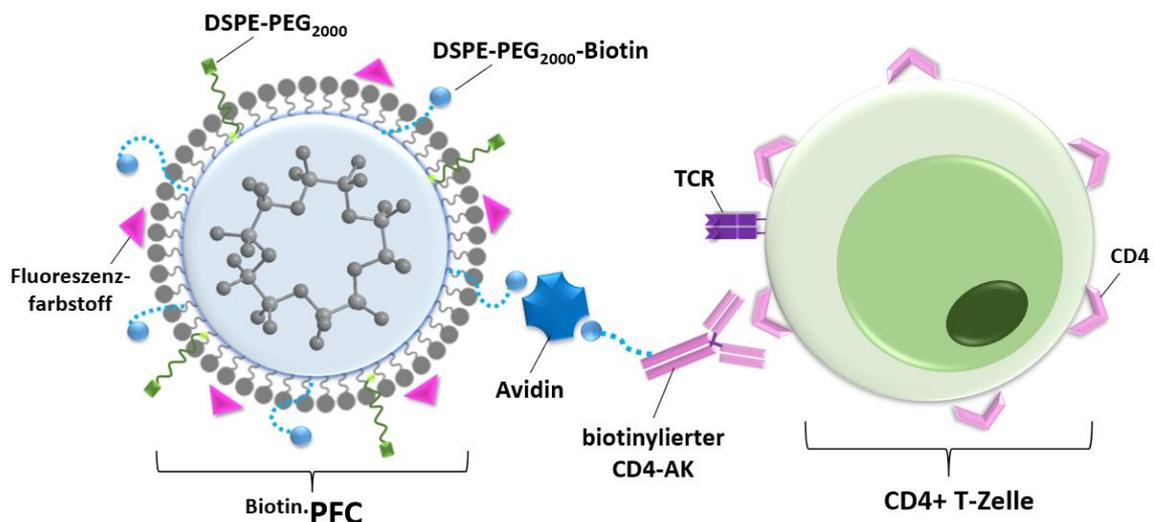


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Biotin-Avidin-Brücke zwischen $CD4^{(+)}$ T-Zellen, NeutrAvidin und biotinylierten PFCs. Die T-Zellen werden mit biotinylierten Antikörpern markiert. NeutrAvidin kann im nächsten Schritt an diese Zellen oder an biotinylierte PFCs gebunden werden. Auf diese Weise entsteht eine Biotin-Avidin-Bindung zwischen Zellen und PFCs. Eine spezifische Ansteuerung der $CD4^{+}$ T-Zellen soll somit ermöglicht werden. TCR = T-Zell-Rezeptor. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.1. Herstellung und Charakterisierung von biotinylierten Cfl -PFCs und $A488$ -PFCs

Um die in Kapitel 4 beschriebene spezifische Bindung von PFCs an $CD4^{(+)}$ T-Zellen zu erzielen und eine Biotin-Avidin-Interaktion zwischen Antikörpern und PFCs unter Zugabe von Avidin zu induzieren, wurden zunächst biotinylierte PFCs ($Biotin$ -PFCs) hergestellt.

Für die Erzeugung der biotinylierten PFCs wurde Perfluoro-15-Kronen-5-Ether (PFCE) und Carboxyfluorescein (Cfl.) beziehungsweise DPPE-Atto488 (A488.) als Fluoreszenzmarker eingesetzt ($Biotin.Cfl$ -PFCs bzw. $Biotin.A488$ -PFCs). Der Herstellungsprozess erfolgte wie oben beschrieben mittels

Hochdruckhomogenisation mit der Ausnahme, dass den Emulsionen 0,01 mol% bis 0,1 mol% DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotin zugesetzt wurde. Die Kontrollemulsion erhielt kein Biotin (0 mol% ^{Cfl.}PFCs bzw. ^{A488.}PFCs). Des Weiteren wurden die PFCs mit 5 mol% DSPE-PEG₂₀₀₀ funktionalisiert.

4.4.1.1. Charakterisierung der ^{Biotin.Cfl.}PFCs

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) erfolgte auch bei diesen PFCs eine Bestimmung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers, PDIs und ζ -Potenzials (Abb. 16A). Die ^{Biotin.Cfl.}PFCs weisen mit einem Biotin-Gehalt von 0,1 mol% mit $135,6 \pm 2,7$ nm den höchsten Partikeldurchmesser auf. Einen signifikant kleineren Durchmesser zeigen die 0,01 mol% PFCs mit $127,4 \pm 0,9$ nm. Das ζ -Potential beträgt für alle PFCs Werte zwischen -35 mV und -45 mV. Der PDI schwankt um Werte von 0,15 bis 0,22.

Die Fluoreszenzsignale der PFCs wurden mit dem *IVIS Lumina II* gemessen. Abbildung 16B zeigt sowohl die Fluoreszenzaufnahmen der Kontrollemulsion und die der Carboxyfluoresceinmarkierten PFCs. Die MFI der Kontrolle beträgt $3,5 \times 10^4 \pm 9,8 \times 10^3$ und die der 0 mol% ^{Cfl.}PFCs $6 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$. Für 0,01 mol% ^{Biotin.Cfl.}PFCs liegt der Wert bei $5,4 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^3$ und für 0,1 mol% ^{Biotin.Cfl.}PFCs bei $4,4 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^3$. Die Fluoreszenzsignale der ^{Cfl.}PFCs sind gegenüber der Kontrollemulsion durchschnittlich etwa 1,2- bis 1,7-mal stärker (Abb. 16C). Signifikant ist hier lediglich der Unterschied der Fluoreszenzen zwischen der Kontrolle und der 0 mol% PFCs.

Für die MRT-Messungen wurden die zu analysierenden PFCs in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden neben einem weiteren mit Wasser gefüllten Reaktionsgefäß platziert. Dieses dient als Hilfsmittel zur korrekten Lokalisation und Identifizierung der Proben in der anschließenden Auswertung. Abbildung 16D zeigt die ¹H und ¹⁹F-Aufnahmen sowie das ¹H/¹⁹F-Überlagerungsbild aus der MRT-Messung. Visuell lässt sich im ¹⁹F-Bild als auch in der Überlagerung ein, im Verhältnis zu den anderen beiden Emulsionen, schwächeres Signal der 0,01 mol% ^{Biotin.Cfl.}PFCs feststellen. Die Quantifizierung der Messergebnisse bestätigen diese Beobachtung (Abb. 16E). Das stärkste ¹⁹F-Signal haben hier die 0 mol% ^{Cfl.}PFCs mit einem SNR von $218,3 \pm 118,7$, gefolgt von dem 0,1 mol% ^{Biotin.Cfl.}PFC (SNR: $210,7 \pm 78,4$). Das SNR der 0,01 mol% PFCs liegt bei $134 \pm 53,2$ und ist somit etwa 1,6-mal schwächer als das der beiden anderen Emulsionen. Es können keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Signalen der Emulsionen ermittelt werden.

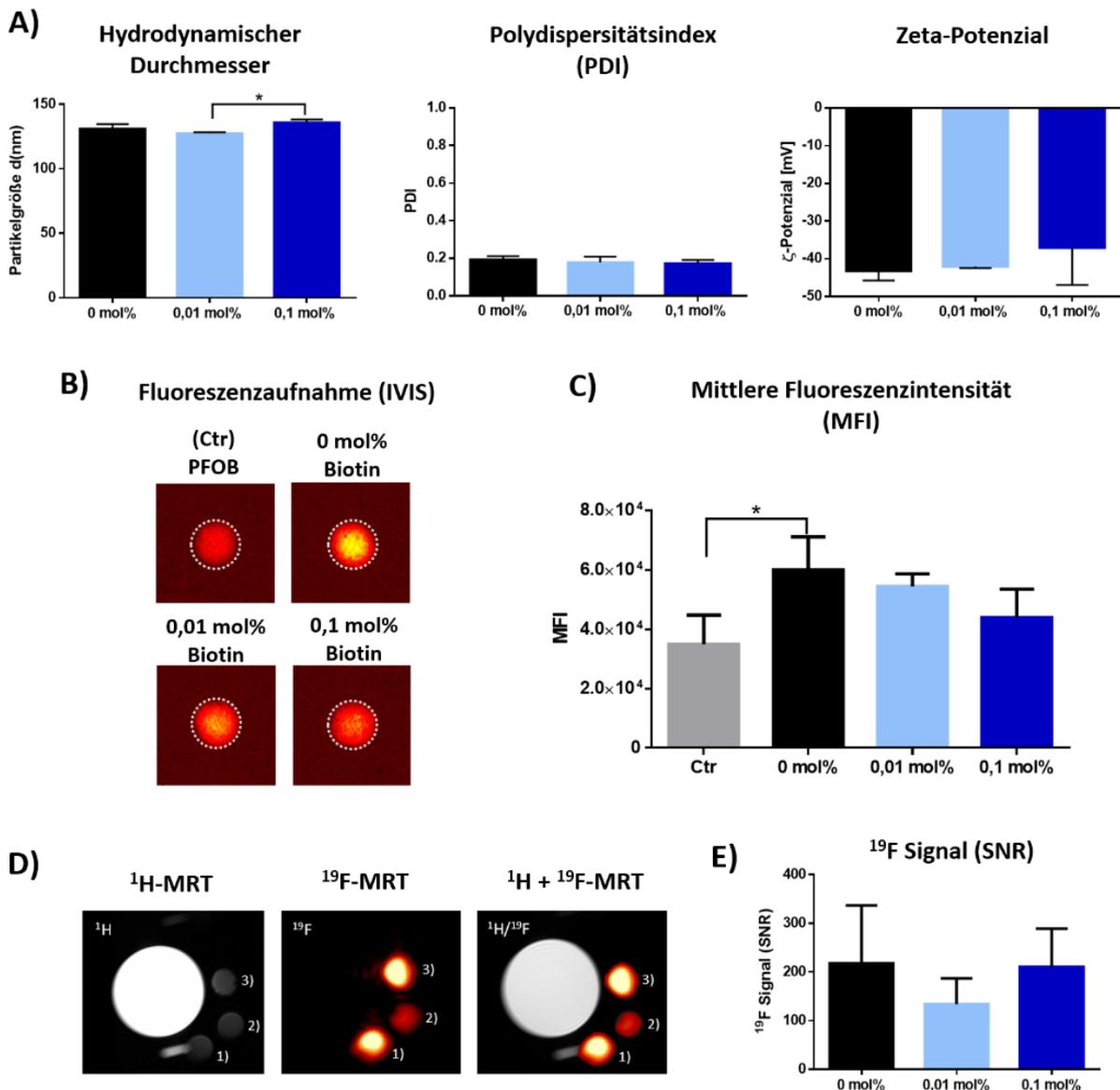


Abbildung 16: A) DLS-Messungen von ^{Biotin.Cfl}-PFCs. Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der dynamischen Lichtstreuung (DLS) für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (**links**), den Polydispersitätsindex (PDI) (**Mitte**) und das Zeta-Potenzial in mV (**rechts**). **B)** Messung der Fluoreszenzeigenschaften von ^{Cfl}-PFCE-PFCs. Fluoreszenzaufnahme der nicht-biotinylierten ^{Cfl}-PFCs (0 mol% Biotin) und der biotinylierten ^{Biotin.Cfl}-PFCs (0,01 mol% und 0,1 mol% Biotin). **C)** Quantifizierung der detektierten Fluoreszenzsignale als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). **D)** ¹H/¹⁹F-MRT der ^{Cfl}-PFCE-PFCs. Messungen von nicht-biotinylierten ^{Cfl}-PFCs (**1**), 0,01 mol% Biotin-^{Cfl}-PFCs (**2**), 0,1 mol% Biotin-^{Cfl}-PFCs (**3**). **E)** Quantifizierung der ¹⁹F Signale als Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio; SNR). Mittelwerte ± SD; n = 3-5. * = p<0,05. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.1.2. Charakterisierung der ^{Biotin.A488}-PFCs

Die Charakterisierung der ^{Biotin.A488}-PFCs erfolgte unter anderem mittels DLS und NTA. Die Graphen für die Partikelgrößenverteilung aus der DLS- und NTA-Messung sind in Abbildung 17A und 17D zu sehen. Sie visualisieren die homogene Verteilung der Partikel bezüglich ihres Durchmessers in einem Größenbereich von 100 bis 150 nm. Die Ergebnisse der DLS zeigen, dass die PFCs mit einem

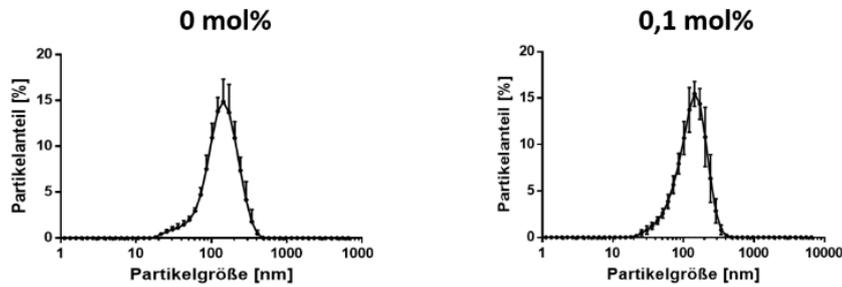
Biotingehalt von 0,1 mol% (^{Biotin.A488}.PFCE-PFCs) und einer Partikelgröße von $130,2 \pm 1,1$ nm etwas größer sind als die nicht-biotinylierten PFCs (^{A488}.PFCs) ($126 \pm 2,8$ nm). In der NTA fallen ebenso die 0 mol% PFCs mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $108,7 \pm 10$ nm kleiner aus als die 0,1 mol% ^{Biotin.A488}.PFCs mit $112,1 \pm 9,7$ nm. Das ζ -Potenzial nimmt Werte von $-36,2 \pm 1,5$ mV für die ^{Biotin.A488}.PFCE-PFCs und $-37,7 \pm 1,5$ mV für die ^{A488}.PFCE-PFCs an. Der PDI beträgt für beide Emulsionen etwa 0,2 und bestätigt die monodisperse Verteilung der Partikel. Mittels NTA werden für die 0 mol% PFCs $2,611 \times 10^{13} \pm 9,729 \times 10^{12}$ Partikel/ml gemessen, für die 0,1 mol% PFCs $2,697 \times 10^{13} \pm 9,7821 \times 10^{12}$ Partikel/ml (Abb. 17C/D). Statistische Tests liefern kein signifikantes Ergebnis bezüglich vorhandener Unterschiede in Partikeldurchmesser, PDI, Zeta-Potenzial oder Partikelkonzentration bei Vergleich der beiden PFCs.

Neben der Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung und NTA sollte die Charakterisierung auch die Analyse der Fluoreszenzeigenschaften und ¹⁹F-Signale der PFCs beinhalten. Die Fluoreszenzbilder der Emulsionen sind in Abbildung 18A, die quantitative Auswertung der Messsignale in Abbildung 18B zu sehen. Für die Kontrollemulsion liegt das Signal bei $3,1 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3$ MFI, für die 0 mol% PFCs bei $1,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$ MFI und bei $1,4 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3$ für die 0,1 mol% PFCs. Sowohl die 0 mol% PFCs als auch die biotinylierten PFCs zeigen ein signifikant stärkeres Emissionssignal als die Kontrolle.

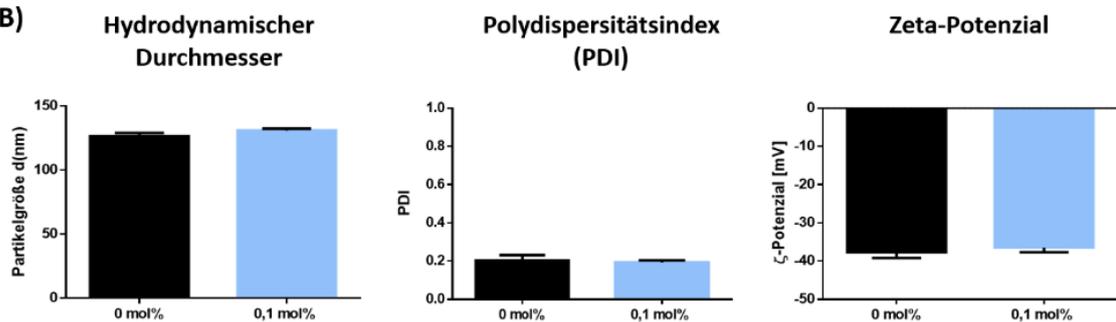
Die Durchführung der MRT-Messungen erfolgte nach gleichem Prinzip wie oben beschrieben. In Abbildung 18C sind die mittels MRT produzierten ¹H-, ¹⁹F- und die ¹H/¹⁹F-Aufnahmen zu sehen. Für die Messung der ¹⁹F-Signale wurde das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt und quantifiziert. Das SNR der 0 mol% PFCs liegt bei $145,2 \pm 81,9$. Mit einem SNR von $212 \pm 135,4$ ist der Wert für die 0,1 mol% PFCs zwar etwa 1,5-mal höher, signifikant ist der Unterschied jedoch nicht (Abb. 18D).

DLS-Messung

A)

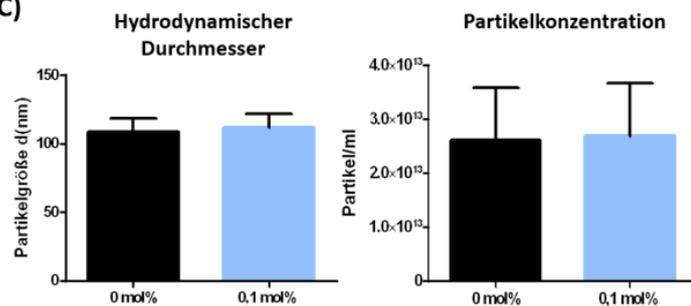


B)



NTA-Messung

C)



D)

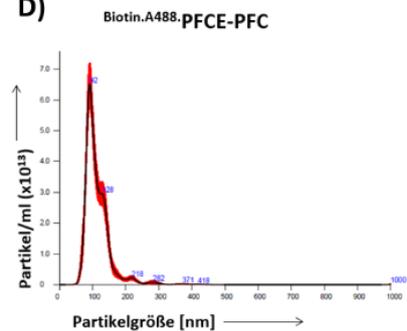


Abbildung 17: DLS- und NTA-Messungen der Biotin.A488-PFCE-PFCs. A) Graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung aus der DLS-Messung und B) der Ergebnisse für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (links), den Polydispersitätsindex (PDI) (Mitte) und das Zeta-Potenzial in mV (rechts). Der Anteil des DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotins am Gesamtlipidgehalt ist in mol% angegeben (0 mol% und 0,1 mol%). C) Ergebnisse der NTA-Messungen von 0 mol%-Biotin A₄₈₈PFCE-PFCs und 0,1 mol% Biotin.A₄₈₈PFCE-PFCs für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (oben) und die Partikelkonzentration in Partikel/ml (unten) und D) der Partikelgrößenverteilung. Mittelwerte ± SD; n = 3 – 6. Quelle: Eigene Darstellung

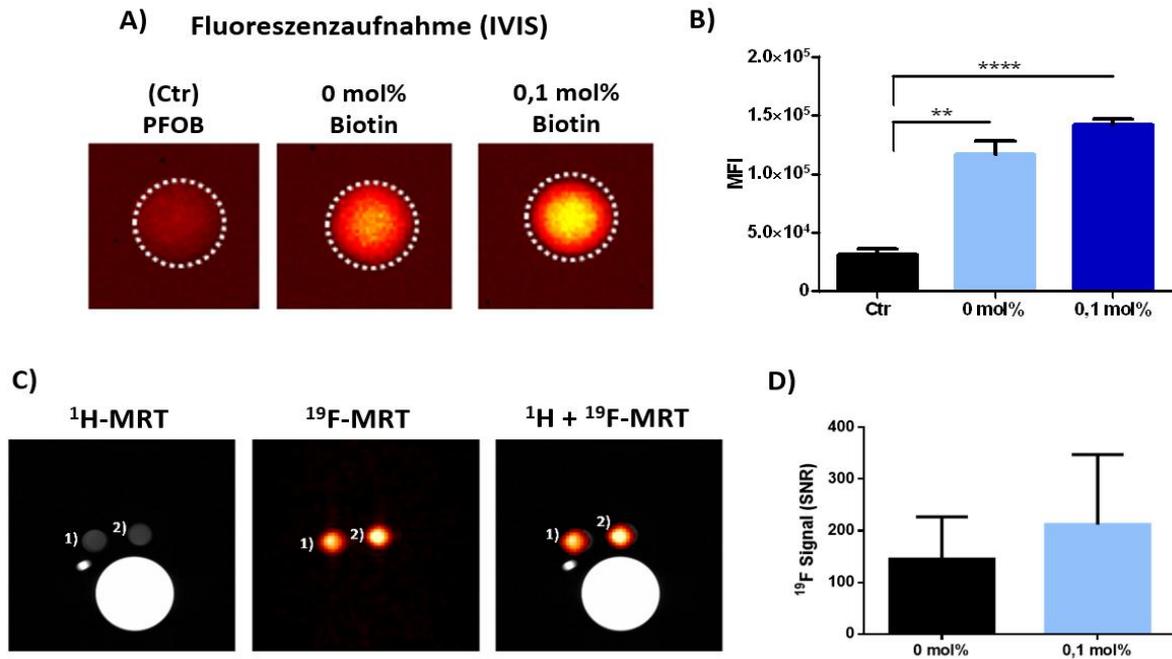


Abbildung 18: Fluoreszenzeigenschaften von biotinylierten und nicht-biotinylierten ^{A488}PFCE-PFCs. **A)** Fluoreszenzaufnahme der nicht-biotinylierten ^{A488}PFCs (0 mol% Biotin) und der biotinylierten ^{Biotin.A488}PFCs (0,1 mol% Biotin). **B)** Quantifizierung der detektierten Fluoreszenzsignale als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). **¹H/¹⁹F-MRT von ^{A488}PFCE-PFCs.** **C)** MRT-Messungen von je 10 µl nicht-biotinylierten ^{A488}PFCs (**1**) und 0,1 mol% ^{Biotin.A488}PFCs (**2**). **D)** Quantifizierung der detektierten ¹⁹F Signale als Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio; SNR). Mittelwerte ± SD; n = 3 - 6. ** = p<0,01; **** = p<0,0001. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.1.3. Validierung der Biotinylierung

Im Anschluss an die Charakterisierung sollte überprüft werden, ob die Integration von Biotin (0,01 mol% bzw. 0,1 mol%) in die Lipidschicht der Emulsionen während des Herstellungsprozesses der PFCs erfolgreich war. Dazu wurden die zu überprüfenden PFCs, wie es in Abbildung 19E veranschaulicht wird, mit Avidin-Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Fluoreszenzsignale der in den Säulen verbliebenen Agarose mittels *IVIS* sowie deren ¹⁹F Signale mittels MRT-Messungen bestimmt.

Abbildung 19A zeigt die Fluoreszenzaufnahme sowie das Überlagerungsbild der Avidin-Agarose-Säulen aus der *IVIS*-Messung für die ^{Biotin.Cfl}PFCs. Die quantitative Auswertung der ¹⁹F-Signale, angegeben als Signal-Rausch-Verhältnis (SNR), findet sich in Abbildung 19B. Nicht nur visuell, sondern auch quantitativ ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzsignale der Agarosen mit biotinylierten PFCs signifikant stärker sind als derer, die PFCs ohne Biotin-Anteil erhielten. Die MFI liegt für letztere bei $1,04 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^5$. Für die Agarose mit 0,01 mol% ^{Biotin.Cfl}PFCs sind die Werte etwa doppelt so hoch. Für die 0,1 mol% ^{Biotin.Cfl}PFCs beträgt sie $4,53 \times 10^6 \pm 6,65 \times 10^5$ und ist damit etwa 4,5-mal höher. Zudem ist das Signal der 0,1 mol% PFCs mit einem signifikanten Unterschied etwa doppelt so hoch wie das der 0,01 mol% PFCs.

Die Proben wurden ebenfalls mittels MRT analysiert. Die ^1H - und ^{19}F -Aufnahmen sowie die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Überlagerung der Avidin-Agarose-Säulen sind in Abbildung 19C zu sehen. Darüber hinaus ist die Quantifizierung der ^{19}F -Signale abgebildet (Abb. 19D). Auch hier ist ein deutlicher visueller und quantitativer Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Biotin-Anteil auszumachen. Das SNR der Agarosen, die zuvor mit biotinylierten PFCs inkubiert worden sind, ist deutlich stärker als jenes, das von der Agarose mit PFCs ohne Biotin-Anteil detektiert wird. Dieses liegt für die 0 mol% $^{\text{Cfl}}$ -PFCs bei $7,1 \pm 6,7$, bei den 0,01 mol% $^{\text{Biotin.Cfl}}$ -PFCs bei $26 \pm 10,8$ und für die 0,1 mol% $^{\text{Biotin.Cfl}}$ -PFCs bei $31,2 \pm 5,9$. Damit sind die Signale der biotinylierten PFCs etwa 4-mal höher als die der nicht biotinylierten Probe.

Da auch die hier verwendeten 0,1 mol% $^{\text{Biotin.A488}}$ -PFCs einen Biotin-Anteil haben, sollte wie auch bei den $^{\text{Biotin.Cfl}}$ -PFCs geprüft werden, ob das Einbringen des DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotins (0,1 mol%) in die Lipidschicht erfolgreich war. Die mittels *IVIS* gemessenen Fluoreszenzeigenschaften des in den Säulen verbliebenen Agarosegels (Abb. 17A/B) lassen erkennen, dass die Signale der Agarose-Säulen, welche die $^{\text{Biotin.A488}}$ -PFCE-PFCs enthielten, deutlich stärker sind als derer, die PFCs ohne Biotin-Anteil erhielten. Die MFI liegt nach Inkubation mit 0 mol% PFCs bei $1,7 \times 10^6 \pm 4,55 \times 10^5$. Demgegenüber nimmt sie nach Inkubation mit 0,1 mol% PFCs einen Wert von $4,78 \times 10^6 \pm 6,91 \times 10^5$ an und ist damit signifikant höher.

Im Anschluss an die Messung der Fluoreszenzsignale wurden ebenfalls MRT-Messungen der Säulen durchgeführt. Abbildung 20C/D zeigt die hierbei erzielten Ergebnisse: Dargestellt sind MRT-Bilder, darunter befinden sich die ^1H - und ^{19}F -Aufnahmen sowie die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Überlagerung der Avidin-Agarose-Säulen. Visuell ist ein deutliches Signal im ^{19}F -Scan der Säulen, die mit 0,1 mol% $^{\text{Biotin.A488}}$ -PFCs inkubiert wurden, zu erkennen (Abb. 20C). Dies ist bei Verwendung der 0 mol% PFCs nicht vorhanden. Neben den Aufnahmen wurden die Messsignale, die in den Agarosen detektiert wurden, quantitativ ausgewertet (Abb. 20D). Das SNR der Probe, welche mit 0 mol% PFCs inkubiert wurde, beträgt $3,47 \pm 0,7$. Im Vergleich dazu liegt das SNR der Agarose, die mit biotinylierten PFCs inkubiert wurde, mit einem Wert von $31,7 \pm 16,9$ etwa 9-mal und damit signifikant höher.

Sowohl für die $^{\text{Biotin.Cfl}}$ -PFCs als auch die $^{\text{Biotin.A488}}$ -PFCs deuten die Ergebnisse der Fluoreszenz- und MRT-Messungen auf eine erfolgreiche Bindung der Biotin-PFCs an die in dem Agarosegel befindlichen Avidin-Beads hin. Zudem scheint der höhere Anteil des Biotins von 0,1 mol%, verglichen mit einem Anteil von 0,01 mol%, eine vermehrte Anreicherung im Agarosegel zu bewirken, was an den stärkeren Fluoreszenzsignalen und höheren SNR-Werten deutlich wird.

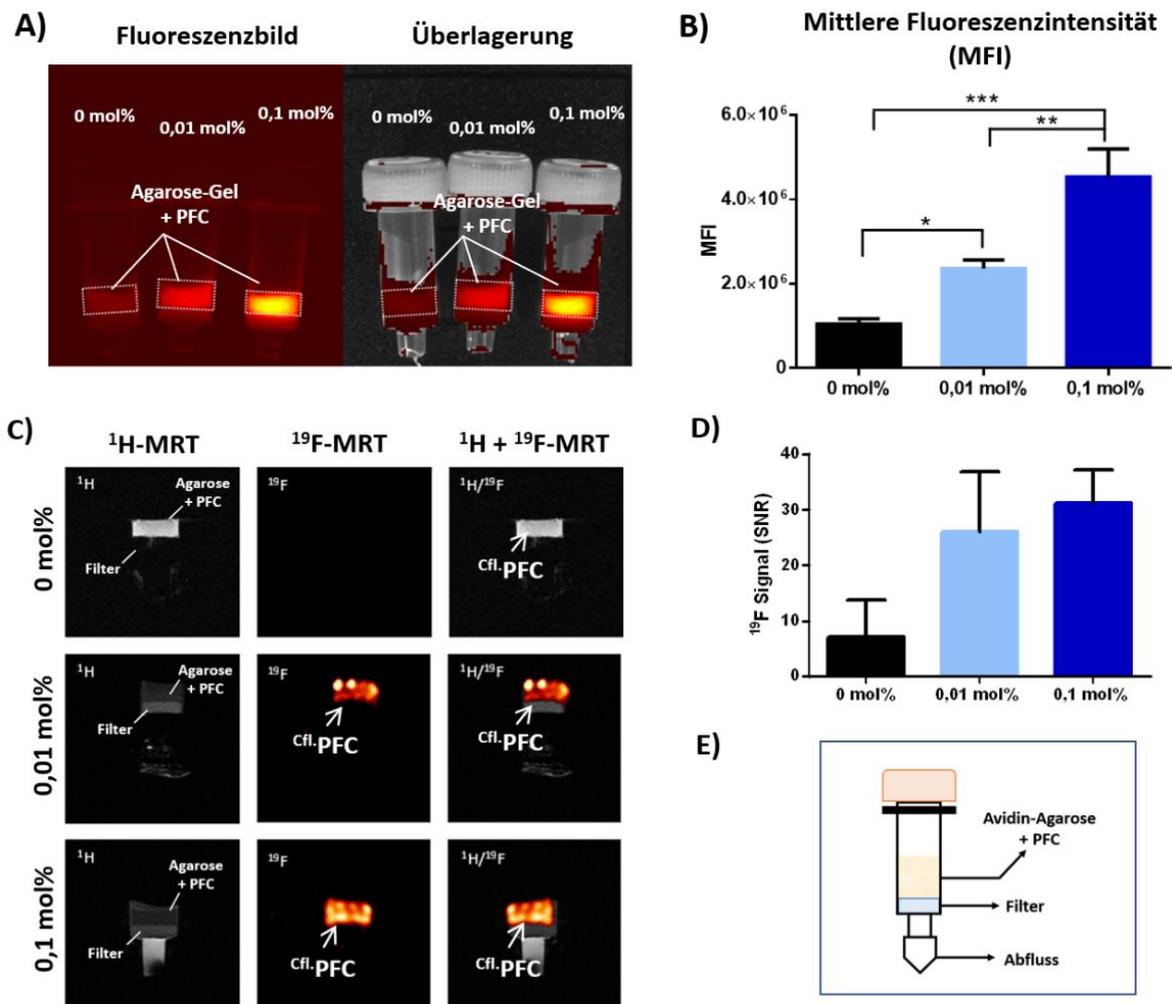


Abbildung 19: Bindung von Biotin. Cfl.-PFCs an Avidin-Agarose. **A)** *IVIS*-Fluoreszenzaufnahme (**links**) und Überlagerungsbild der Fotoaufnahme und des Fluoreszenzbildes (**rechts**) der Avidin-Agarose-Säulen nach Inkubation mit nicht-biotinylierten (0 mol% Biotin) beziehungsweise mit biotinylierten Cfl.-PFCE-PFCs (0,01 oder 0,1 mol% Biotin). **B)** Quantifizierung der detektierten Fluoreszenzsignale als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). **C)** ¹H/¹⁹F-MRT von Avidin-Agarose-Säulen nach Inkubation mit Cfl.-PFCE-PFCs. Säulen mit integriertem Filter wurden zunächst mit Avidin-Agarose-Gel und entsprechenden PFCs aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Säulen mit Phosphat-Glycerol-Puffer gewaschen und Partikel, die nicht an die Avidin-Beads gebunden haben, aus dem Agarosegel ausgewaschen. Anschließend erfolgten MRT-Messungen von Säulen mit nicht-biotinylierten Cfl.-PFCs (**oben**), 0,01 mol% Biotin.Cfl.-PFCs (**Mitte**) oder 0,1 mol% Biotin.Cfl.-PFCs (**unten**). **D)** Quantifizierung der detektierten ¹⁹F-Signale als Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*; SNR). **E)** Schematische Darstellung einer Avidin-Agarose-Säule. Mittelwerte ± SD; n = 3-5. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001. Quelle: Eigene Darstellung

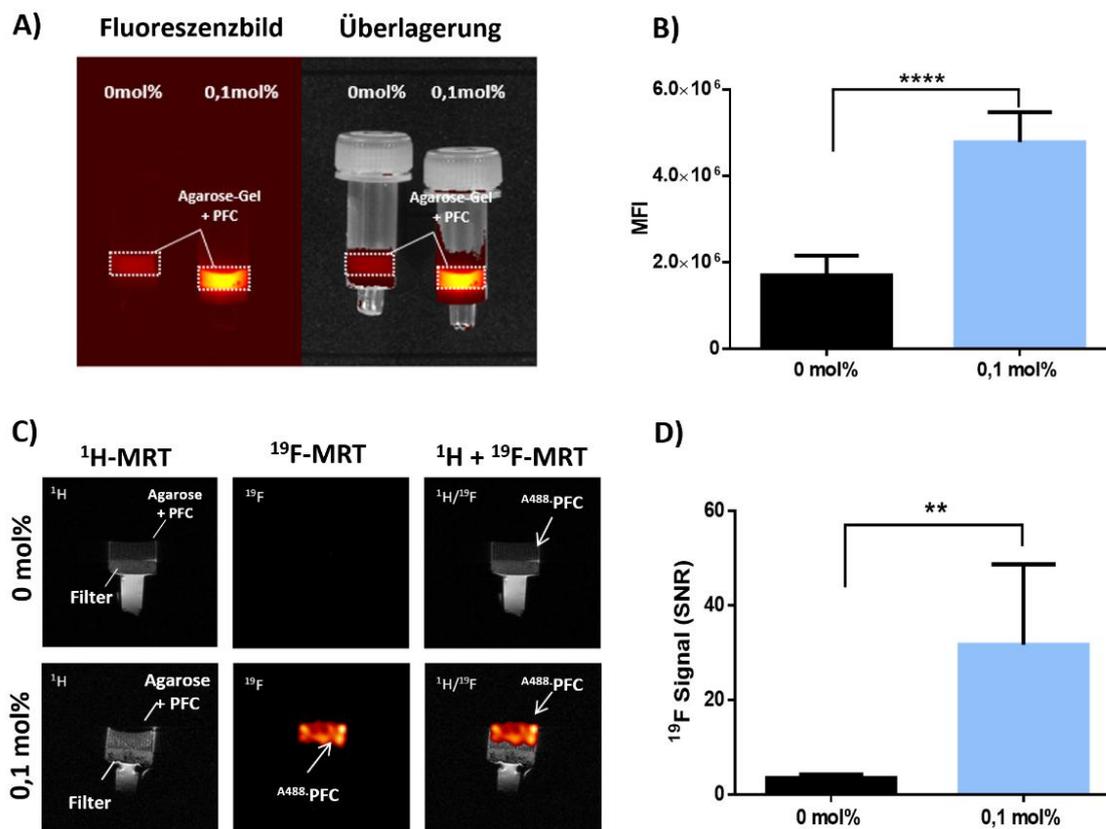


Abbildung 20: Bindung von ^{Biotin.A488}-PFCs an Avidin-Agarose. **A)** IVIS-Fluoreszenzaufnahme (**links**) und Überlagerung (**rechts**) von Avidin-Agarose-Säulen nach Inkubation mit nicht-biotinylierten (0 mol% Biotin) bzw. mit biotinylierten ^{A488}-PFCE-PFCs (0,1 mol% Biotin). **B)** Quantifizierung der detektierten Fluoreszenzsignale als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). **C)** ¹H/¹⁹F-MRT von Avidin-Agarose-Säulen nach Inkubation mit ^{Biotin.A488}-PFCE-PFCs. Säulen mit integriertem Filter wurden zunächst mit Avidin-Agarose-Gel und entsprechenden PFCs aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Säulen gewaschen und Partikel, die nicht an die Avidin-Beads gebunden haben, ausgewaschen. Anschließend erfolgten MRT-Messungen von Säulen mit nicht-biotinylierten ^{A488}-PFCs (**oben**) bzw. 0,1 mol% ^{Biotin.A488}-PFCs (**unten**). **D)** Quantifizierung der detektierten ¹⁹F-Signale als Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*; SNR). Mittelwerte ± SD; n = 6. ** = p < 0,01; **** = p < 0,0001. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.2. Passive Aufnahme biotinylierter ^{A488}-PFCs

In Vorbereitung auf das aktive Targeting mit den biotinylierten PFCs sollte zunächst die passive Aufnahme der 0 mol% ^{A488}-PFCs und der 0,1 mol% ^{Biotin.A488}-PFCs untersucht werden. Dazu wurden im ersten Schritt aus humanem Blut isolierte Leukozyten mit CD45-, CD11b- und biotinylierten CD4-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden den Zellsuspensionen unterschiedliche Konzentrationen PFC zugesetzt. In Abbildung 21 ist die Quantifizierung der zellulären Anreicherung der 0 mol% PFCs (schwarz) und der 0,1 mol% PFCs (blau) durch Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten dargestellt. Wie hier erkenntlich wird, ist die Partikelaufnahme durch die Monozyten am höchsten, gefolgt von den Neutrophilen. Dabei werden biotinylierte PFCs im Vergleich zu den nicht-biotinylierten durch die myeloiden Zellen in 1,5- bis 1,8-Facher Menge

aufgenommen. Außerdem wird der Anstieg der Signalstärke bei steigender PFC-Konzentration veranschaulicht. Für die Neutrophilen ist beispielsweise ein Anstieg der MFI um circa 60 % nach Inkubation mit 30 μ l 0 mol% PFCs zu beobachten. Der Trend ist ebenfalls bei den Monozyten und den Lymphoiden zu erkennen, wobei die Partikelinkorporation durch die CD4⁽⁻⁾ Lymphoiden unabhängig von der PFC-Konzentration stets gering ist. Dabei ist zu beachten, dass im passiven Targeting eine geringe Partikelinkorporation durch die lymphoiden Immunzellen angesichts ihrer geringen Phagozytosefähigkeit zu erwarten ist.^{1,2} Es gibt keine nennenswerten Differenzen zwischen den Aufnahmen der 0 mol% und der 0,1 mol% PFCs. Dennoch bewirkt die Inkubation mit 0,1 mol% PFCs geringfügig höhere MFI-Werte der myeloiden Zellen. Resümierend deuten die Ergebnisse auf eine bevorzugte passive Aufnahme der biotinylierten PFCs durch Monozyten und Neutrophilen hin, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant ist.

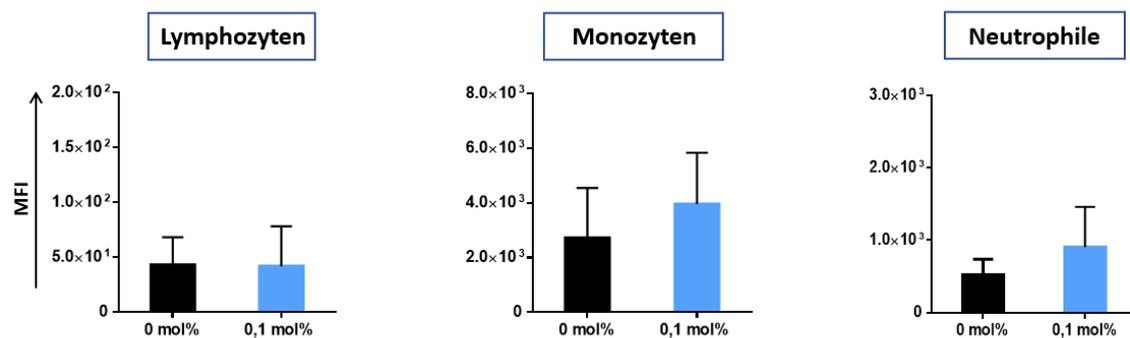


Abbildung 21: Passives Targeting mit (biotinylierten) ^{A488}-PFCs. Quantitative Analyse der zellulären Aufnahme von ^{A488}-PFCE-PFCs (0 mol% Biotin; **schwarz**) und ^{Biotin.A488}-PFCE-PFCs (0,1 mol% Biotin; **blau**). Leukozyten aus humanem Blut wurden mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und biotinylierten CD4-Antikörpern markiert und mit ^{A488}-PFCs bzw. ^{Biotin.A488}-PFCs inkubiert. Die Partikelaufnahme durch die Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen wurde anhand ihrer Fluoreszenzsignale als MFI mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Mittelwerte \pm SD; n = 3 – 5. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.3. Aktives Targeting von ^{Av.Biotin}-PFCs

Der nächste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der spezifischen Ansteuerung der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen unter Nutzung der Biotin-Avidin-Interaktion zwischen Zellen und PFCs. Um diese umzusetzen, sollten folgend PFCs hergestellt werden, die einen Biotin-Avidin-Anker in ihrer Lipidschicht tragen. Dieser Anker soll die in Kapitel 4 beschriebene Kopplung der PFCs an die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen ermöglichen.

4.4.3.1. Herstellung, Charakterisierung und Targeting der ^{Av.Biotin}-PFCs

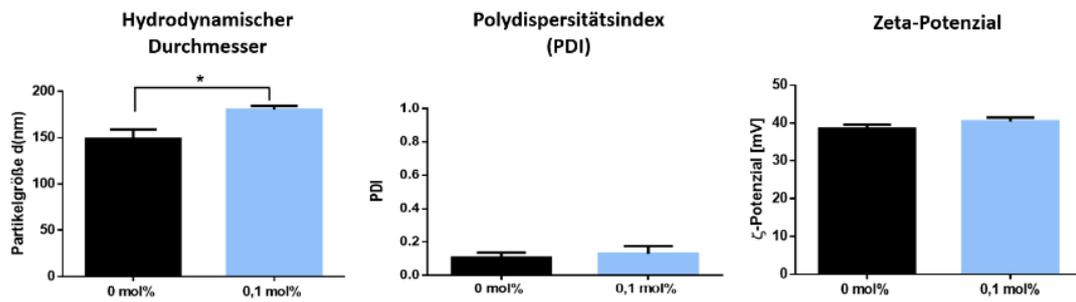
Für die Herstellung der ^{Av.Biotin}-PFCs wurden die bereits hergestellten ^{Biotin.A488}-PFCs genutzt. Diese wurden zunächst mit NeutrAvidin inkubiert und anschließend zentrifugiert, um freies NeutrAvidin aus der Suspension zu entfernen.

Um zu untersuchen, ob die Verknüpfung von NeutrAvidin mit den biotinylierten PFCs einen Einfluss auf deren Eigenschaften hat, wurden sie mittels DLS analysiert (Abb. 22A). Die 0,1 mol% ^{Av.Biotin}-PFCs sind mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $180,2 \pm 4$ nm signifikant größer als die 0 mol% ^{Av.Biotin}-PFCs, die einen Durchmesser von $148,7 \pm 10,1$ nm haben. Der PDI liegt für beide PFCs etwa bei 0,1. Sonderbar bei diesen Messungen ist das positive Zeta-Potenzial beider Emulsionen, das bei den bisher untersuchten PFCs einen negativen Wert hat. Das Zeta-Potenzial der 0 mol% ^{Av.Biotin}-PFCs beträgt $+38,5 \pm 1,1$ mV und das der 0,1 mol% ^{Av.Biotin}-PFCs $+40,4 \pm 1$ mV.

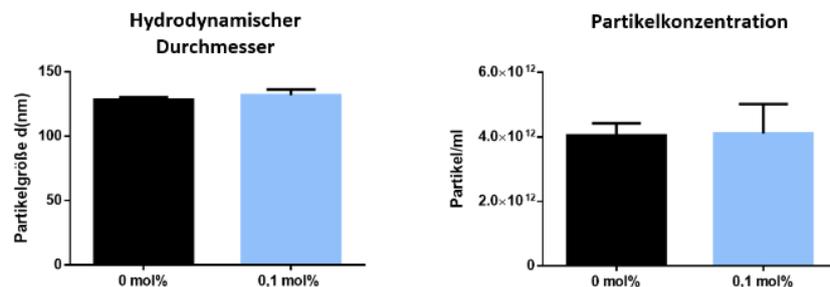
Die weitere Charakterisierung erfolgte mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse mit Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße und Partikelkonzentration/ml. Abbildung 22B zeigt die Ergebnisse der Messungen. Beide Emulsionen weisen etwa 4×10^{12} Partikel pro Milliliter auf. Der hydrodynamische Durchmesser wird in der NTA mit etwa 130 nm gemessen. Insgesamt sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich beider PFCs festzustellen.

Anschließend an die Charakterisierung sollte das aktive Targeting mit den ^{Av.Biotin}-PFCs getestet werden. Dazu wurden Leukozyten mit CD45-, CD11b- sowie mit biotinylierten CD4-Antikörpern inkubiert und die Aufnahme dieser durch die Zellen nach Inkubation mit den PFCs durchflusszytometrisch bestimmt. Betrachtet man die dabei detektierten Lymphozyten, lassen sich nur wenige A488-markierte Zellen ausmachen (Abb. 22C). Trotz Einsatz verschiedener PFC-Konzentrationen zeigt sich kein Einfluss dessen auf die Partikelaufnahme. Auch kann kein signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme der 0 mol% und den 0,1 mol% ^{Av.Biotin}-PFCs ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu werden für die Monozyten und Neutrophilen circa 1,5-Fach höhere MFI-Werte nach Inkubation mit 0,1 mol% PFCs detektiert. Festzuhalten ist, dass für alle Populationen nur niedrige MFI-Werte gemessen werden und keine Population mit den hier verwendeten PFCs erfolgreich markiert werden kann. Ursache dessen ist möglicherweise, dass die Verknüpfung von Avidin an die Biotingruppe der PFCs nicht erfolgreich war.

A) DLS-Messung



B) NTA-Messung



C)

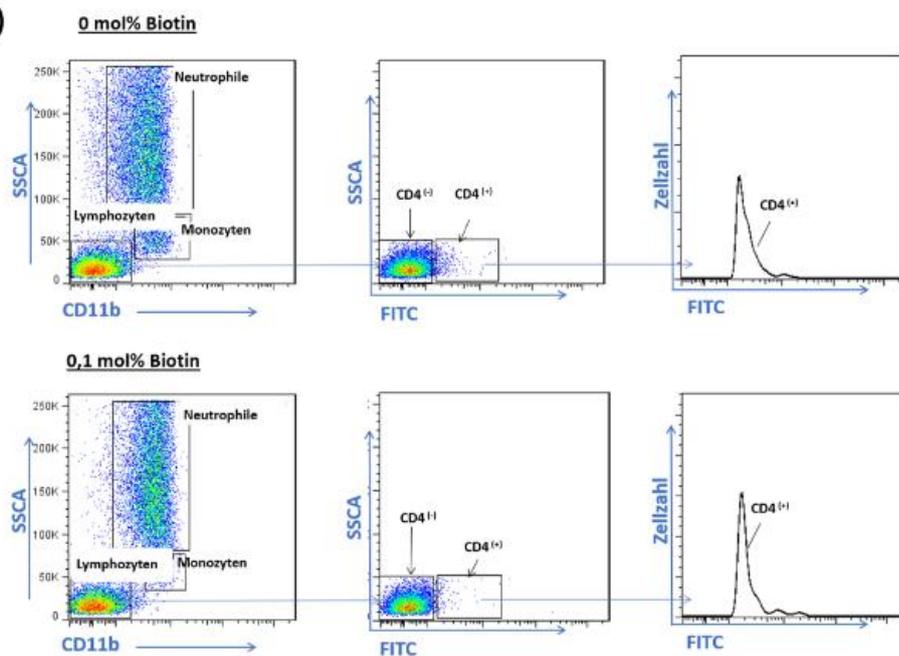


Abbildung 22: Charakterisierung der ^{Av}Biotin-PFCs und Analyse ihrer Aufnahme im aktiven Targeting mit ^{Av}Biotin-PFCs. A) Ergebnisse der DLS-Messungen der ^{Av}Biotin-PFCs (0 mol% und 0,1 mol% Biotin) für die Partikelgröße in nm (**links**), den Polydispersitätsindex (PDI) (**Mitte**) und das Zeta-Potenzial in mV (**rechts**). **B)** Ergebnisse der NTA-Messungen von 0 mol% und 0,1 mol% ^{Av}Biotin-PFCs für die durchschnittliche Partikelgröße in nm (**links**) und die Partikelkonzentration in Partikel/ml (**rechts**). **C)** Durchflusszytometrische Analyse humaner Leukozyten nach Inkubation mit 0 mol% bzw. 0,1 mol% ^{Av}Biotin-PFCs. Signal der Lymphozyten im FITC-Kanal (**Mitte**) nach Markierung mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und biotinylierten CD4-Antikörpern sowie anschließender Inkubation mit ^{Av}Biotin-PFCs. Darstellung des Fluoreszenzsignals der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im Histogramm (**rechts**). Eine klar abgrenzbare CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Population ist nicht darstellbar. Mittelwerte ± SD; n = 1 – 3. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.4. Analyse der zellulären Aufnahme biotinylierter PFCs

Um zu untersuchen, ob ein aktives Targeting, ergo eine aktive Aufnahme der PFCs durch CD4⁽⁺⁾ T-Zellen unter Einsatz von biotinylierten PFCs und Anti-CD4⁽⁺⁾-Antikörpern umgesetzt werden kann, wurden im nächsten Versuchsteil Leukozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Biotin.Cfl.PFCs und Biotin.A488.PFCs inkubiert. Dabei war das Ziel die spezifische Ansteuerung der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen über eine Biotin-Avidin-Wechselwirkung.

Die Zellen wurden dafür zunächst mit CD45-, CD11b- und biotinylierten CD4-Antikörpern inkubiert, um eine Differenzierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten (CD11b⁽⁺⁾), CD4⁽⁻⁾ Lymphoiden (CD11b⁽⁻⁾ und CD4⁽⁻⁾) und CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zu ermöglichen. Nachdem die Proben gewaschen wurden, wurden sie mit NeutrAvidin bei gleichen Bedingungen inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet erneut gewaschen, um überschüssiges NeutrAvidin aus der Suspension zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit 0 mol% und 0,1 mol% der Biotin.PFCs inkubiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI-Färbung markiert und die Probe anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

4.4.4.1. Aktives Targeting von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit Biotin.Cfl.PFCs

Um die Markierung der Zellen mit Biotin.Cfl.PFCs zu ermitteln, wurde die MFI der jeweiligen Zellpopulation bestimmt. Abbildung 23 zeigt die in der durchflusszytometrischen Analyse identifizierten Immunzellpopulationen nach Inkubation mit dem nicht-biotinylierten Cfl.PFC und dem Biotin.Cfl.PFC.

Die Ergebnisse zeigen, dass besonders die CD4⁽⁻⁾ Zellen unabhängig von dem verwendeten PFC niedrige Fluoreszenzwerte aufweisen (MFI < 10). Auch die Neutrophilen haben eine geringe Partikelaufnahme, wobei sich in der Aufnahme von biotinylierten und nicht-biotinylierten Emulsionen kein Unterschied feststellen lässt. Bei den Monozyten scheint die Aufnahme der 0 mol% PFCs mit der der 0,1 mol% PFCs vergleichbar zu sein. Am höchsten sind die Fluoreszenzsignale der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen – diese liegen nach Inkubation mit 0 mol% Biotin.Cfl.PFCs bei $4,2 \times 10^2 \pm 7,2 \times 10^1$ und nach Inkubation mit den 0,1 mol% Biotin.Cfl.PFCs bei $1,1 \times 10^3 \pm 5,2 \times 10^2$ und somit etwa 2,6-mal höher. Damit kann hier eine präferentielle Aufnahme der biotinylierten PFCs durch die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen beobachtet werden, was ebenfalls durch den Rechtsshift der Kurve für diesen Zelltyp in Abbildung 23A visualisiert wird. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass dies auf die hier induzierte Biotin-Avidin-Bindung zwischen PFCs und Zellen zurückzuführen ist. Gleichzeitig deutet die im Vergleich dazu niedrigere PFC-Aufnahme durch die Neutrophilen und die Monozyten auf eine Unterdrückung ihrer phagozytosebedingten Aufnahme hin.

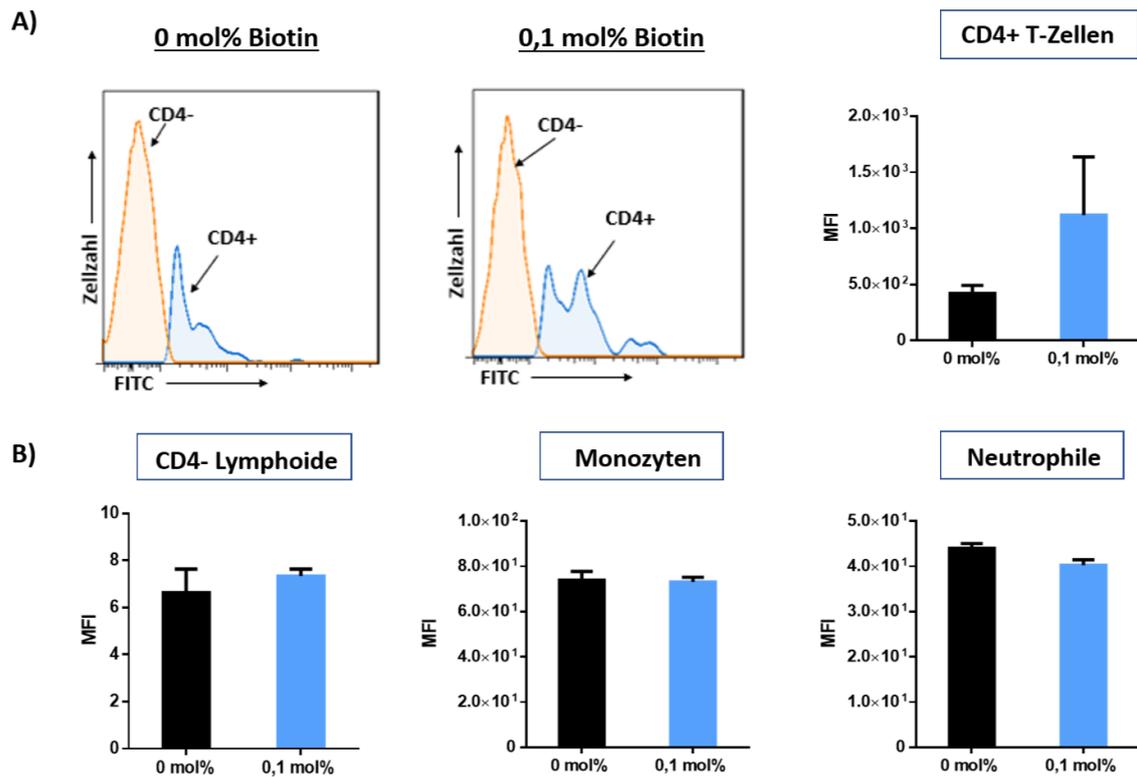


Abbildung 23: Aktives Targeting mit Carboxyfluorescein-markierten (biotinylierten) PFCs. Analyse der zellulären Aufnahme von Cfl.PFCe-PFCs und $\text{Biotin.Cfl.PFCe-PFCs}$ durch **A)** $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zellen und **B)** $\text{CD4}^{(-)}$ Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen. Leukozyten aus humanem Blut wurden mit CD45- , CD11b- und biotinylierten CD4-Antikörpern markiert und anschließend mit NeutrAvidin inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit Cfl.PFCs (**0 mol% Biotin; schwarz**) bzw. Biotin.Cfl.PFCs (**0,1 mol% Biotin; blau**) inkubiert. Zur Analyse der PFC-Aufnahme durch die Leukozyten wurden die Fluoreszenzsignale der Zellpopulationen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Mittelwerte \pm SD; $n = 3$. Quelle: Eigene Darstellung

4.4.4.2. Aktives Targeting von $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zellen mit Biotin.A488-PFCs

Im nächsten Schritt sollte das aktive Targeting mit Biotin.A488-PFCs untersucht werden. Nach Inkubation mit den oben genannten Antikörpern und NeutrAvidin wurde den Zellen unterschiedliche Mengen Biotin.A488-PFCs zugesetzt. Die dabei entstehende Biotin-Avidin-Interaktion sollte auch hier zu einer gezielten Ansteuerung der $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zellen führen.

Die PFC-Aufnahme der jeweiligen Populationen ist in Abbildung 24 als MFI des FITC-Signals dargestellt. Untersucht werden Unterschiede in der zellulären Aufnahme von A488-PFCs (schwarz) und Biotin.A488-PFCs (blau). Im Vergleich wird ersichtlich, dass besonders die myeloiden Zellen eine sehr hohe Partikelaufnahme mit MFIs von bis zu 8×10^3 für die Monozyten, erreichen. Im Gegensatz zu den übrigen Zelltypen zeigen die $\text{CD4}^{(-)}$ Lymphozyten eine etwa 20- bis 30-mal niedrigere MFI, was für eine nur geringe PFC-Aufnahme spricht. Die $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zellen zeigen nach Inkubation mit Biotin.A488-PFCs eine etwa 1,2-mal höhere MFI als nach Inkubation mit A488-PFCs . Zu erkennen ist dies ebenfalls an einem marginalen Rechtsshift der Kurve für die $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zellen in den Histogrammen

(Abb. 24A). Wie an den Diagrammen in Abbildung 24B zu erkennen ist, führt die Inkubation mit den biotinylierten PFCs aber nicht nur bei den CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, sondern auch bei den Monozyten und den CD4⁽⁻⁾ Lymphozyten zu einer höheren Aufnahme als die Inkubation mit den nicht-biotinylierten PFCs. Hinsichtlich dessen kann in diesem Versuch nicht eindeutig auf eine spezifische Ansteuerung der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mithilfe einer Avidin-Biotin-Interaktion geschlossen werden. Möglicherweise unterliegt die höhere Aufnahme einer anderen einflussnehmenden Eigenschaft der biotinylierten PFCs.

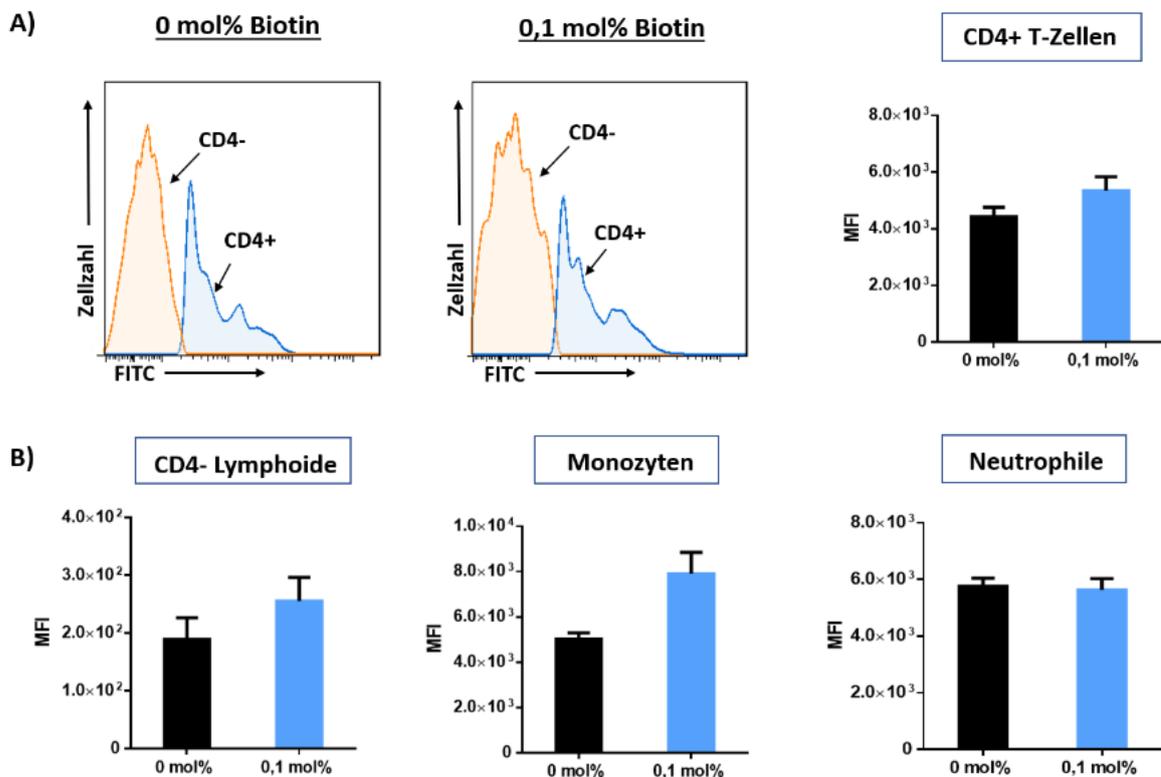


Abbildung 24: Aktives Targeting mit (biotinylierten) A⁴⁸⁸-PFCs. A) Analyse der zellulären Aufnahme von A⁴⁸⁸-PFCE-PFCs und Biotin.A⁴⁸⁸-PFCE-PFCs durch A) CD4⁽⁺⁾ T-Zellen und B) CD4⁽⁻⁾ Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen. Leukozyten aus humanem Blut wurden mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und biotinylierten CD4-Antikörpern markiert und dann mit NeutrAvidin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit A⁴⁸⁸-PFCs (0 mol% Biotin; schwarz) bzw. Biotin.A⁴⁸⁸-PFCs (0,1 mol% Biotin; blau) inkubiert. Zur Analyse der PFC-Aufnahme durch die Leukozyten wurden die Fluoreszenzsignale der Zellpopulationen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Mittelwerte ± SD; n = 3. Quelle: Eigene Darstellung

5. Diskussion

CD4⁽⁺⁾ T-Zellen sind zentrale Akteure bei der Regulation der Immunantwort und der Abwehr von pathogenen Erregern. Sie sind von fundamentaler Bedeutung für die adaptive Immunantwort sowie für die Koordination und Modulation einer Vielzahl von Immunreaktionen. Umgesetzt wird dies unter anderem über die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen. Diese Signalmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung zwischen verschiedenen Immunzellen, sodass Makrophagen, B-Zellen, Dendritische Zellen oder auch CD8⁽⁺⁾ T-Zellen rekrutiert und aktiviert werden können.⁷⁰ Dabei balancieren CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zwischen pro-inflammatorischen Signalen, welche die Entzündungsreaktion fördern, und anti-inflammatorischen Signalen, die eine überschießende Immunreaktion eindämmen. Darüber hinaus besitzen sie proliferative Eigenschaften, die im Rahmen der Gewebeheilung den Gewebeumbau, beispielsweise durch Fibrosierung und Angiogenese, initiieren.^{24,25} Benannt sind diese Lymphozyten nach dem Oberflächenprotein CD4 (*CD = Cluster of Differentiation*), das auf ihrer Zelloberfläche exprimiert wird. CD4⁽⁺⁾ T-Zellen agieren hochkomplex: Nicht nur die diversen Aufgaben der verschiedenen Subtypen, darunter z. B. die Th1, die Th2 oder auch die Th17 (die regulatorischen T-Zellen), sondern auch ihre Fähigkeit zur Plastizität, also zum Tausch der Subgruppe, machen ein höheres Verständnis ihres Daseins und eine bessere Kategorisierung wünschenswert. Angesichts ihrer Schlüsselrolle im Immunsystem und ihrer Bedeutung für die Gesundheit und das Wohlbefinden ist es von großem Interesse, diese Zellen im Organismus zu untersuchen. Die Verfolgung ihrer Dynamik, Verteilung und Wechselwirkungen im menschlichen Körper in Echtzeit würde neue Einblicke in Immunantworten bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebs ermöglichen und zugleich die Entwicklung neuer Therapien und Impfstoffe fördern.

Da CD4⁽⁺⁾ T-Zellen aufgrund geringer Phagozytoseaktivität nicht bzw. kaum im passiven Targeting markiert werden können, erfolgt die Markierung und Darstellung von Zellen in unserer Arbeitsgruppe über das aktive Targeting von Perfluorkarbon-Nanomeclusionen (PFCs). Hierbei handelt es sich um Nanopartikel auf Perfluorkarbon-Basis. Perfluorkarbonate sind nichttoxische fluoridierte Kohlenstoffmoleküle. Ihr Einsatz als Kontrastmittel in der ¹⁹F-MRT eignet sich optimal für eine hintergrundfreie und ortsspezifische Signaldetektion der von ihnen markierten Strukturen. Grundlage für die passive Inkorporation dieser Partikel ist die Phagozytose. Allerdings kann eine effiziente Phagozytose nur durch professionelle Phagozyten erfolgen, zu welchen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und Osteoklasten zählen.^{71,72} Bekannt ist, dass die PFCs vor allem von Monozyten und Makrophagen internalisiert werden.⁴³ Nach

aktuellem Kenntnisstand können T-Zellen keine professionelle Phagozytose durchführen⁷¹ und lassen sich daher vergleichsweise schlecht durch Nanopartikel markieren. Dies macht CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zu einer besonders interessanten Zellgruppe für das aktive Targeting, welches die selektive und zielgerichtete Steuerung von Substanzen an einen definierten Wirkort bezeichnet.⁴⁷ In diesem Sinne ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die spezifische Kopplung von PFCs an CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Antikörper unter Reduktion der unspezifischen PFC-Aufnahme durch phagozytisch aktive Zellen zu ermöglichen. Umgesetzt werden sollte dies durch eine Biotin-Avidin-Bindung zwischen PFCs und den CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Antikörpern. Dazu wurden PFCs mit Biotin funktionalisiert sowie CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit biotinylierten Anti-CD4-Antikörpern markiert. Unter Inkubation von NeutrAvidin mit den markierten T-Zellen und anschließender Inkubation mit PFCs sollte auf diese Weise die Biotin-NeutrAvidin-Wechselwirkung zur direkten Oberflächenmarkierung der Zielzellen führen. Zusätzlich wurden die Partikel PEGyliert, um die Aufnahme durch Phagozyten zu mindern.

Die effiziente Reduktion der Phagozytose durch Monozyten und neutrophile Granulozyten im Rahmen der Partikel-PEGylierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Weiterhin wurde die Biotinylierung von PFCs, ihre Bindung an NeutrAvidin sowie die Kopplung biotinylierter Antikörper an humane CD4⁽⁺⁾ T-Zellen bestätigt. Schlussendlich konnte ebenfalls eine spezifische Bindung biotinylierter PFCs an CD4⁽⁺⁾ T-Zellen dargestellt werden.

5.1. Nanopartikel als Kontrastmittelträger in der ¹⁹F-Bildgebung

In bisherigen Ansätzen zur T-Zell-Visualisierung wurden unter anderem Verfahren angewendet, welche eine Isolierung der Zellen aus Blutproben sowie eine anschließende Beladung der Zellen mit Biomarkern erforderlich machen. Diese Schritte sind notwendige Vorbereitungen, um die Zellen im weiteren Verlauf gezielt im Rahmen von Targeting-Strategien nutzen und analysieren zu können. Beispielhaft hierfür dient die Arbeit von Yaghoubi *et al.*: In dieser wurden zytotoxische T-Zellen aus peripherem Blut eines an einem Glioblastom erkrankten Patienten isoliert und in diese ein Reporter-gen eingeschleust, um die Darstellung der Zellen bzw. des Tumors über PET zu gewähren.³⁷ Als weiteres Beispiel dient die Studie von Huang *et al.*, in welcher murine T-Zellen isoliert und über eine Maleimidbindung so funktionalisiert wurden, dass sie chemotherapeutikabeladene Nanokapseln auf ihrer Oberfläche tragen.⁶¹ Anschließend wurden diese funktionalisierten T-Zellen in tumortragende Mäuse transferiert, wo sie als aktive Vektoren dienten, um das Medikament gezielt in die lymphatischen Organe zu transportieren. Ein solches Vorgehen, bei welchem die Zellen zunächst aus dem Blut isoliert und strukturell sowie funktionell verändert werden, hat tiefgreifende Auswirkungen auf die physiologische Zellmigration. Die Isolation der Zellen aus ihrem natürlichen

Umfeld unterbricht ihre Interaktion mit anderen Komponenten des Immunsystems und der Mikroumgebung. Durch die Modifikation können zudem wichtige Eigenschaften wie die Adhäsion, Chemotaxis oder der gerichtete Transport durch Gewebe beeinflusst werden. Dies führt dazu, dass die natürliche Migration der Zellen nicht mehr gegeben ist, wodurch die Aussagekraft der gewonnenen Erkenntnisse über das physiologische Verhalten der Zellen eingeschränkt sein kann. Zukünftig sollten daher Methoden entwickelt werden, unter welcher die Zellen ohne vorherige Entfernung aus dem Körper und Beladung mit Biomarkern o.Ä. in bildgebenden Verfahren dargestellt werden können. Um dies umzusetzen, müssen zunächst humane CD4⁽⁺⁾ T-Zellen im aktiven Targeting direkt und spezifisch angesteuert werden können. Eine Möglichkeit ist das Targeting von Zielzellen mittels Nanocarrier. Diese dienen unter anderem als Kontrastmittel, welche mit Biomarkern, Antikörpern, Peptiden etc. beladen werden können und eine spezifische Zellmarkierung ermöglichen.⁴⁷ Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, geringen Toxizität und biologischen Abbaubarkeit sind die polymeren Nanopartikel eine vielversprechende Klasse der Nanocarrier. Durch diese Merkmale sind sie besonders gut für den Einsatz in der medizinischen Bildgebung geeignet. Des Weiteren sind polymere NPs gut in ihrem chemischen Aufbau, ihrer Degradationskinetik und ihren mechanischen Eigenschaften modifizierbar, was die Anpassung an verschiedene Anforderungen in der Bildgebung und an verschiedene physiologische Bedingungen erlaubt.⁶⁵ Zur Verbesserung des Nebenwirkungsprofils und der Wirksamkeit von Medikamenten können *Nanodelivery*-Systeme ebenfalls genutzt werden, um therapeutische Wirkstoffe in niedrigeren Dosen zu konzentrieren und sie im gezielten Targeting lokalisiert und gewebsspezifisch einzusetzen.¹⁰ Begrenzt ist ihre Funktion, wenn sie nicht gezielt eingesetzt werden oder ihre Akkumulation beispielsweise auf den *Enhanced Permeability and Retention* Effekt (EPR-Effekt) begrenzt ist. Das mononukleäre-phagozytäre System (MPS), auch als retikuloendotheliales System (RES) bekannt, stellt die primäre Barriere der NPs nach intravenöser Applizierung dar. Die rasche Aufnahme von Nanopartikeln durch das MPS kann zu ungenügender Erreichbarkeit des Wirkortes und somit zur signifikanten Einschränkung ihrer Wirksamkeit führen.⁷³ Eine Akkumulation im MPS, vor allem auch in der Leber und Milz, kann ungünstig sein, sofern diese Orte nicht der gewünschten Ziellokalisation entsprechen.⁷⁴ Weitere Gründe, weshalb die Verabreichungsmodalität zellspezifisch gesteuert werden sollte, um systemische Nebenwirkungen zu verringern.

Die Darstellung entzündlicher Prozesse stellt eine große Herausforderung in der klinischen Diagnostik dar. Bisher ist es zwar möglich, durch Inflammation bedingte Veränderungen des Gewebes bildlich darzustellen, dennoch sind die Methoden, mit welchen sich das Migrationsverhalten und die genaue Lokalisation von Immunzellen und anderen Serummarkern der Inflammation darstellen lassen, sehr begrenzt. Zu nennen sind darunter das Röntgen, die

Sonographie, die MRT, die CT, aber auch die PET und die Szintigraphie. Gerade die kontrastmittelgestützte Bildgebung soll dazu beitragen, bestimmte Strukturen, wie etwa einen Infektfokus, hervorzuheben. Auch Veränderungen des Gewebismetabolismus sind z. B. durch Anreicherung von FDG-haltigem Kontrastmittel in Bereichen mit erhöhter Stoffwechselaktivität in der PET detektierbar.⁷⁵ Jedoch weisen diese Methoden durch mangelnde Gewebedarstellung und/oder schlechte anatomische Genauigkeit und Detailtreue, Strahlenexposition, Kontrastmitteltoxizität, mangelnde Zielgenauigkeit und nicht zuletzt durch hohe Kosten und begrenzte Verfügbarkeiten einige Limitationen auf.⁷⁶ Vor allem die Nanomedizin beschäftigt sich damit, diese Limitationen aufzuheben.⁷⁷ Im Fokus dieser Arbeit steht die Weiterentwicklung der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung, welche über den Einsatz fluorhaltiger Kontrastmittel eine ideale Möglichkeit zur exakten anatomischen Lokalisation der Kontrastmittelanreicherung bietet.⁷⁸ Dafür geeignete Kontrastmittelträger sind die Perfluorkarbon-Nanoemulsionen. Ihre Anhäufung an Entzündungsorten konnte bereits vor etwa 15 Jahren anhand ihrer Darstellung eines Myokardinfarkts und einer zerebralen Ischämie in der ^{19}F -MRT nachgewiesen werden.⁴³ Darüber hinaus konnten in unserer Arbeitsgruppe weitere Entzündungsherde mittels ^{19}F -MRT in präklinischen Modellen identifiziert und visualisiert werden, ein aktives Targeting etabliert und Thromben sowie aktiverte Plättchen abgebildet werden.^{64,79–81} Das Isotop ^{19}F ist MR-aktiv und hat eine sehr geringe biologische Hintergrundhäufigkeit, wodurch es in Organismen mit hoher Empfindlichkeit und Präzision detektiert werden kann. Dies macht es zu einem idealen Kandidaten für die Kernspinresonanzspektroskopie und -bildgebung.⁸² Perfluorkarbonate werden bei typischen lysosomalen pH-Werten nicht abgebaut und überdies sind keine Enzyme bekannt, die sie *in vivo* verstoffwechseln.⁸³ Vor allem PFCE macht sich durch seine lange Halbwertszeit für Forschungsvorhaben über längere Zeiträume interessant.⁸⁴ Die hohe Hydrophobie sowie Lipophobie der PFCs führen dazu, dass sie nicht mit Zellmembranen oder anderen Molekülen interagieren. Dies trägt zusätzlich zu ihrer biologischen Inertheit bei. Selbst in hohen Dosen weisen sie *in vivo* keine Toxizität auf.⁸⁵ Um den Einfluss und die Effektivität der Nanopartikel beurteilen zu können, werden die Leukozyten in dieser Arbeit dennoch aus menschlichem Blut isoliert und erst anschließend mit diesen beladen. Das Augenmerk liegt auf der MR-Bildgebung mittels PFCs zur spezifischen $\text{CD4}^{(+)}$ T-Zell-Ansteuerung und -Visualisierung. Es soll eine Bindung zwischen bildgebender Substanz und Zellen hergestellt werden, ohne dabei toxische Substanzen einzusetzen, um damit die Brücke zur Übertragung dieser Methodik zur Diagnostik am Menschen selbst zu schaffen.

5.2. Einfluss der PFC-Eigenschaften auf die passive zelluläre Aufnahme

Zu Beginn der Arbeit sollte das passive Targeting von vier verschiedenen PFCs (A488 PFCE-, A488 PFCH-, A647 PFCE- und A647 PFCH-PFCs) untersucht werden, um beurteilen zu können, wie das zelluläre Aufnahmeverhalten durch PFC-Eigenschaften wie Partikeldurchmesser, Polydispersitätsindex (PDI) und Zeta-Potenzial beeinflusst wird. Alle in dieser Arbeit hergestellten PFCs wurden dafür mittels DLS, NTA und der Fluoreszenzmessung mit dem *In Vivo Imaging System* analysiert. Dabei sollte auch der Einfluss der Modifizierung, wie z. B. die PEGylierung und Biotinylierung, auf die Begebenheiten der Partikel untersucht und die Auswirkungen struktureller Veränderungen auf das Targeting bewertet werden. Die Analysen bestätigen die Herstellung nahezu monodisperser PFCs in einem Größenbereich von etwa 150 nm bis 250 nm und einem Zeta-Potenzial zwischen -30 mV und -40 mV. Die Höhe des Zeta-Potenzials indiziert die potenzielle Stabilität eines kolloidalen Systems. Ein Zeta-Potenzial, das positiver als +30 mV oder negativer als -30 mV ist, weist auf eine hohe elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln hin. Stoßen sich die Partikel gegenseitig ab, besteht keine Tendenz, dass die Teilchen aggregieren, was die Stabilität der Dispersion gewährleistet.¹²⁶ Dies ist entscheidend für Anwendungen der NPs in der Medikamentenverabreichung oder Diagnostik, wo eine gleichmäßige Verteilung und Funktionalität der Partikel erforderlich ist. Zudem signalisiert es eine reproduzierbare Produktqualität und minimiert unerwünschte Wechselwirkungen in biologischen Systemen.

Die Aufnahme von Partikeln durch Makrophagen wird unter anderem vom Partikeldurchmesser beeinflusst, wobei der dominante Mechanismus – Phagozytose oder Endozytose – von der Partikelgröße und dem Zelltyp abhängt. Partikel mit einer Größe von über 500 nm werden typischerweise durch Phagozytose aufgenommen, da dieser Mechanismus speziell für die Verarbeitung größerer Strukturen ausgelegt ist.^{63,71,72} Kleinere Partikel (<500 nm) können ebenfalls durch Endozytose verarbeitet werden. Dabei werden im passiven Targeting Partikel mit einer Größe von 200 bis 300 nm besser aufgenommen als Partikel, die kleiner als 200 nm sind.⁸⁶ Hieraus würde sich ableiten, dass für das aktive Targeting, bei dem die Aufnahme der Partikel durch Makrophagen minimiert werden soll, eine Partikelgröße von unter 200 nm wahrscheinlich effektiver ist. Als spezialisierte Phagozyten nutzen Makrophagen und Monozyten aber auch bei kleinen Partikeln bevorzugt die Phagozytose. Dies konnten auch Nienhaus *et al.* zeigen: Die in ihrer Arbeit genutzten PFOB-PFCs mit einer Größe von $209 \pm 17,4$ nm wurden von Monozyten nämlich hauptsächlich durch aktive Phagozytose internalisiert.¹²⁷ Im Gegensatz dazu greifen andere Zelltypen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten, bei kleinen Partikeln eher auf Endozytose zurück. Auch das Zeta-Potenzial wirkt auf die Phagozytose und Endozytose der Partikel ein. Ein negatives Zeta-Potenzial kann die

Phagozytose durch bessere Bindung von Opsoninen und Verringerung der Abstoßung zwischen der Phagozytenmembran und dem Partikel fördern. Die dadurch verursachten Wechselwirkungen ermöglichen eine leichtere Erkennung und Bindung durch Phagozyten, was den Aufnahmeprozess fördert.^{87,88}

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse und getrennten Darstellung von Zellpopulationen basierend auf ihren spezifischen Oberflächenmarkern und anderen zellulären Eigenschaften. Anhand der fluoreszenzmarkierten Antikörper und PFCs konnten mittels dieser Methode Daten über die Markierung der Zellgruppen durch die PFCs erhoben werden. Bekannt ist, dass Makrophagen und Monozyten, gefolgt von B-Zellen, die Leukozyten mit der höchsten Phagozytosebereitschaft sind.⁶⁶ Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die myeloiden Zellen in der Mehrheit der Versuche eine höhere PFC-Aufnahme haben als neutrophile Granulozyten. Unter den Lymphoiden zeigen die B-Zellen unter Inkubation mit A488-markierten PFCs höhere Fluoreszenzintensitäten als die T-Zellen. Die CD8⁽⁺⁾ T-Zellen nehmen dabei in der Regel niedrigere MFI-Werte an als die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen. Ähnliche Ergebnisse liefern unter anderem weitere Studien unserer Arbeitsgruppe: Auch Flögel *et al.* beobachteten, dass aus gesunden Tieren isolierte myeloische Zellen der wichtigste Immunzelltyp für die PFC-Internalisierung bei In-vitro-Inkubation im Blut sind.⁴³ In einem viel geringeren Ausmaß war dies in B-Zellen und nur geringfügig in T-Zellen zu sehen. Nach einer Lipopolysaccharid-induzierten Lungenentzündung fanden Ebner *et al.*, dass Neutrophile und Monozyten zunächst ein ähnliches ¹⁹F-Signal aufwiesen, das nach 48 Stunden jedoch stärker in Monozyten nachweisbar war.⁸⁰ Insgesamt ließ sich also feststellen, dass Monozyten und neutrophile Granulozyten die stärkste Partikelaufnahme zeigten. Diese Ergebnisse waren bei dem Targeting von ^{A647}PFCH-PFCs jedoch nicht reproduzierbar: Hier zeigten die Monozyten die niedrigste, die Neutrophilen und CD4⁽⁺⁾ T-Zellen eine vergleichbar hohe Partikelinkorporation. Da sich die ^{A647}PFCH-PFCs in Durchmesser, PDI und Zeta-Potenzial nicht wesentlich von den übrigen getesteten PFCs unterscheiden, ist nicht anzunehmen, dass diese Parameter begründend für diese spezielle zelluläre Verarbeitung der ^{A647}PFCH-PFCs sind. Wichtig zu erwähnen ist, dass der Herstellungsprozess und die Qualität der Materialien einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften der Partikel haben.⁸⁶ Darüber hinaus ist eine konzentrationsabhängige Aufnahme der PFCs erkennbar. In diesem Fall bedeutet das, dass mit steigender Konzentration der Nanoemulsionen in der Zellsuspension in der Regel auch die Aufnahme dieser durch die Immunzellen steigt. Vergleicht man z. B. die zelluläre Aufnahme von 5 µl mit 30 µl ^{A647}PFCE-PFCs, ist zu erkennen, dass die Markierung der Monozyten und Neutrophilen etwa um das Doppelte steigt. Dieser konzentrationsabhängige Anstieg ist, wenn auch nur geringfügig, ebenfalls bei den Lymphozyten zu erkennen. Unerwarteterweise ist die zelluläre

Aufnahme bei Untersuchung der ^{A647}PFCH-PFCs für die T-Zellen am höchsten und für die Monozyten am niedrigsten. Eine genaue Ursache für diese Besonderheit konnte hier nicht gefunden werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Aufnahme von PFCs modell- und phasenabhängig ist. In *in-vitro*-Modellen scheinen Monozyten und Makrophagen hier zu dominieren. Neutrophile nehmen PFCs bevorzugt in frühen, akuten Entzündungsstadien auf, während Monozyten, Makrophagen und adaptive Immunzellen bei chronischen Entzündungen dominieren.¹²⁸ Dies unterstreicht die Komplexität der Immunantwort und die Bedeutung der zeitlichen und räumlichen Dynamik bei der Interpretation von PFC-Signalen.

5.3. PEGylierung von PFCs verringert die zelluläre Aufnahme

In Hinblick auf das Ziel der präzisen Ansteuerung von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen, stellt sich die Frage, wie man gleichzeitig die Partikelaufnahme durch phagozytierende Zellen des MPS mindern kann. Nach intravenöser Applikation von Nanopartikeln findet eine Markierung dieser mit Serumproteinen statt. Dieser Vorgang wird als Opsonierung bezeichnet und bewirkt, dass die NPs von den Abwehrzellen des Immunsystems schneller und effizienter erkannt werden. Dadurch wird die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und Granulozyten deutlich gesteigert. Die wohl bekannteste Methode zur Reduktion dieser Opsonierung ist die Oberflächenmodifikation der Partikel mit Polyethylenglykol. Die PEGylierung erfolgte mittels Sterol-basierter Post-Insertions-Technik, bei welcher bereits hergestellte PFCs mit einem Cholesterol-PEG-Anker modifiziert werden.

Mit der PEGylierung ist eine erniedrigte Aufnahme der Nanopartikel durch Zellen des phagozytären Systems assoziiert sowie eine dadurch bedingte Verlängerung ihrer Halbwertszeit im Blut.⁶⁷ Erklärt wird der Mechanismus durch Bildung einer „Konformationswolke“ durch die PEG-Ketten, welche eine sterische Behinderung der Wechselwirkungen mit Serumproteinen oder die Opsonierung mit anschließender Aufnahme durch das RES verhindert.^{68,89} Zudem gibt es Annahmen, dass die durch die PEG-Ketten bedingte neutralere Oberflächenladung der Partikel zu einer verringerten Adhäsion der Partikel an Zellmembranen und damit zur verringerten Aufnahme durch die Zellen führen.^{89–93} Beobachtet werden zusätzlich darüber hinausreichende immunmodulative Eigenschaften PEGylierter Nanopartikel, darunter eine verringerte Komplementaktivierung, Neutrophilenrekrutierung und eine geringere Expression costimulatorischer Moleküle der dendritischen Zellen.⁹⁴ Interessanterweise scheint jedoch eine verhältnismäßig hohe PEG-Oberflächendichte eine Aktivierung des Komplementsystems mit entsprechend verringerter Zirkulationshalbwertszeit zu verursachen, wie es in der Arbeit von Hak *et al.* beobachtet wurde.⁹⁵

Im Übrigen konnte gezeigt werden, dass unter Umständen Anti-PEG-Antikörper gebildet werden, welche die Aufnahme PEGylierter Nanopartikel über die Mukosa signifikant einschränken.^{96,97} Somit ist PEG ein Stoff, welcher Immunreaktionen auslösen kann. Beschrieben wurden mögliche relevante, meist kutane arzneimittelbezogene Hypersensitivitätsreaktionen bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen, die auf die PEGylierung der angewendeten Substanzen zurückgeführt werden konnten.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Nicht zuletzt können Anti-PEG-Antikörper zur Neutralisation der Partikel führen, welche ihre therapeutische und diagnostische Effizienz stört.¹⁰¹

Um die Auswirkung verschiedener PEG-Dichten auf die PFC-Aufnahme zu untersuchen, erfolgte hier die Inkubation humaner Leukozyten mit PEGylierten ^{A647}- und ^{A488}PFCE-PFCs. Vergleicht man die Eigenschaften der PEG-enthaltenden und nicht PEG-enthaltenden PFCs (Partikelgröße, Oberflächenladung, PDI), lassen sich hinsichtlich des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel Unterschiede feststellen. Betrachtet man die Ergebnisse der DLS und der NTA, werden gegensätzliche Beobachtungen gemacht: Während in der DLS die Partikelgröße mit Grad der PEGylierung signifikant zunimmt, nimmt sie in der NTA ab. Dabei bewegen sich die Partikel stets in einem Größenbereich zwischen 150 nm und 200 nm und sind in dieser Eigenschaft vergleichbar mit den in dieser verwendeten Arbeit nicht-PEGylierten Partikeln (vgl. Abb. 10). In der Analyse der Eigenschaften zeigt sich in der DLS anschließend eine zu erwartende Größenzunahme der Partikel von etwa 10 nm. Überraschenderweise lässt sich in der NTA eine bis zu 20 nm geringere durchschnittliche Partikelgröße der PEGylierten PFCs im Vergleich zu nicht-PEGylierten feststellen. Wie oben beschrieben, bewegen sich Partikel einer solchen Größe dennoch in einem Bereich, der zur Endozytose- sowie Phagozytose-vermittelten Verarbeitung führt. Die Größenzunahme sollte also demnach keinen bedeutenden Einfluss auf die Partikelaufnahme haben. Es ergeben sich keine signifikanten Einflüsse der PEG-Dichte auf den Polydispersitätsindex. Nennenswert ist aber ebenfalls, dass sich das Zeta-Potenzial mit steigendem PEG-Anteil signifikant ändert und in einen positiveren Bereich bewegt, was auf eine neutralere Oberfläche der Emulsionen durch das PEG zurückzuführen ist. Die Oberflächenladung der hier hergestellten PFCs bewegt sich von -34 mV auf -27 mV um etwa 7 mV in einen weniger negativen Bereich. Außerdem korreliert eine Positivierung der Ladung mit steigendem PEG-Gehalt, sodass angenommen werden könnte, dass die Oberflächenladung den Grad der PEGylierung indiziert. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass das Zeta-Potenzial nur beschränkt Aussagen über die Oberflächendeckung der NPs zulässt und die Pufferbedingungen sowie der vorliegende pH-Wert einen nicht unbedeutenden Einfluss darauf haben.⁶⁶ Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der zellulären Aufnahme durch myeloide Zellen und B-Zellen nach Modifizierung der PFCs mit 20 mol% PEG. Vergleichbare Ergebnisse konnten in unserer Arbeitsgruppe schon mehrfach demonstriert werden: In der Arbeit von Temme *et al.* zeigte

sich beispielsweise eine deutlich geringere Aufnahme PEGylierter PFCs durch Monozyten der THP-1 Zelllinie verglichen zur Aufnahme nicht PEGylierter PFCs.⁶⁴ Grapentin *et al.* konnten dies ebenfalls anhand der Aufnahme Rhodamin-markierter PFCs durch J774.A1-Makrophagen *in vitro* zeigen.⁶³ Auch wenn die PEGylierung hauptsächlich der Reduktion der Verarbeitung der NPs durch Monozyten und Makrophagen dient, sollte nicht unerwähnt bleiben, dass hiervon offensichtlich auch T-Zellen betroffen sind (vgl. Abb. 12). Ein weiterer Grund, weshalb ein aktives Targeting etabliert werden muss, um die zellspezifische Ansteuerung zu ermöglichen.

Neben der zellulären Aufnahme wurde in dieser Arbeit der Einfluss der PEGylierung auf die Zellviabilität geprüft. In den hier stattgefundenen Versuchen lässt sich eine bis zu 3-fach erhöhte Mortalität der Zellen ermitteln. So steigt der Anteil toter Zellen nach Inkubation der Suspension mit PFCs von 10% ohne PEG-Anteil auf circa 30% mit 20 mol% PEG-Anteil (vgl. Abb. 13). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die PEGylierung unter Inkaufnahme eines erhöhten Zellsterbens geschieht. Obwohl PEG als nichttoxisches Polymer gilt, konnten einige Untersuchungen eine Zytotoxizität PEGylierter Nanopartikel feststellen. Am ehesten ist diese auf PEG-induzierten oxidativen Stress zurückzuführen.¹⁰² Nichtsdestotrotz ist die Datenlage dazu spärlich. Es würde sich folglich anbieten, den Einfluss der PEGylierung auf die Zellviabilität in zukünftigen Arbeiten genauer zu inspizieren.

Neben PEG-Konjugaten könnten auch Cholesterin-Konjugate für einen erhöhten Zelltod verantwortlich sein. In der Nanomedizin findet Cholesterin hauptsächlich in der Produktion von Lipid-Nanopartikeln Anwendung. Aufgrunddessen, dass sie sehr biokompatibel und biologisch abbaubar sind, gelten Lipid-NPs als weniger toxisch und immunogen als andere NPs.¹²⁹ Østergaard *et al.* konnten in ihrer Arbeit allerdings zeigen, dass die Konjugation von Cholesterin an synthetische Nukleotidsequenzen zur gezielten Modulation von RNA, die Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotide (PS-ASOs), die Bindung an Plasmaproteine verbessert und ihre Potenz in Muskelgewebe steigert. Gleichzeitig führt dies jedoch bei höheren Dosen zu erhöhter Toxizität.¹³⁰ Dies deutet darauf hin, dass Cholesterin-konjugierte Nanopartikel aufgrund ähnlicher Verteilungsmuster und Proteininteraktionen ebenfalls ein erhöhtes Toxizitätsrisiko aufweisen könnten. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Arbeit von Wada *et al.*, ebenfalls am Beispiel Cholesterin-konjugierter Antisense-Oligonukleotide.¹³¹ Allerdings bleibt die Hypothese, dass Cholesterin-Konjugate durch toxische Wirkung die Zellmortalität erhöhen, in der aktuellen Literatur bisher unzureichend belegt und bedarf weiterer Forschung.

Bezugnehmend auf seine Limitationen könnten zunehmend Alternativen zu Polyethylenglykol relevant werden. Eine Übersicht zu diesen liefert die Arbeit von Khutoryanskiy. Genannt werden in

dieser unter anderem Polyoxazoline, Polysarcosin und Polyvinylalkohol, ebenfalls Polymere.⁹¹ Neben einer höheren Stabilität und Biokompatibilität bieten sie auch eine bessere biologische Abbaubarkeit als PEG.¹⁰³ PEG stellt unter den Stealth Polymeren dennoch den Goldstandard dar, zumal einige der genannten Alternativen keine klinische Zulassung besitzen und ihr Einsatz nur ungenügend erforscht ist.¹⁰⁴

Es ist festzuhalten, dass die PEGylierung effektiv dazu beiträgt, die exklusive Ansteuerung von Lymphozyten zu unterstützen. Prospektiv hat sie *in vivo* zudem das Potenzial, eine frühzeitige Metabolisierung der PFCs vor Erreichen eines Entzündungsortes, an welchem die Target-Zellen akkumulieren, zu verhindern.

5.4. Aktives Targeting von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mittels Avidin-Biotin-Kopplung

Das aktive Targeting sollte mit der Biotin-Avidin-Bindung umgesetzt werden. Ziel war es, CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit biotinylierten Antikörpern zu markieren und in einem weiteren Schritt an diese Zellen NeutrAvidin zu binden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit biotinylierten PFCs inkubiert. Auf diese Weise sollte die direkte Bindung zwischen Zellen, NeutrAvidin und PFCs hergestellt werden.

Wie in 1.5.3. bereits beschrieben, ist Avidin ein Glykoprotein, welches aus vier identischen Untereinheiten besteht, welche je ein Molekül Biotin hochaffin binden können. Wegen seines Kohlenhydratgehaltes und seines basischen pHs weist Avidin relativ unspezifische Bindungseigenschaften auf, die durch Deglykolisierung, wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten NeutrAvidin, reduziert werden.¹⁰⁵ Die Bindungsaffinität für Biotin bleibt dabei erhalten, da das Kohlenhydrat für diese Aktivität keine Relevanz hat.¹⁰⁶ NeutrAvidin-Nanokomplexe scheinen im Vergleich zu Avidin-basierten NPs zudem zellulär besser aufgenommen zu werden, was im Targeting durchaus von Bedeutung ist.¹⁰⁷ Die Avidin-Biotin-Wechselwirkung dient seit Jahrzehnten als Werkzeug in biomedizinischen und nanotechnologischen Anwendungen wie der Diagnostik, Affinitätsreinigung von Proteinen und Medikamentenverabreichung. Es gibt ein wachsendes Interesse an der Erforschung dieser in nanoskaligen Verabreichungssystemen für pharmazeutische Wirkstoffe, Proteine, Impfstoffe, monoklonale Antikörper und Nukleinsäuren. Insbesondere die einfache Herstellung ohne Verlust der chemischen und biologischen Eigenschaften der gekoppelten Komponenten macht das Avidin-Biotin-System zu einer vielversprechenden Methode für die Nanotechnologie. Avidin-basierte Nanopartikel wurden bereits als Diagnosesysteme für verschiedene Tumoren und Oberflächenantigene untersucht. Gutes Potenzial bieten die Avidin-

Biotin-Cargos als Wirkstoffträger in der Krebstherapie, um systemische Nebenwirkungen von Medikamenten, wie beispielsweise Doxorubicin, zu reduzieren.¹⁰⁸ Hinsichtlich der Tatsache, dass einige Krebszellen Biotinrezeptoren überexprimieren, stellt Biotin hier nämlich einen wichtigen Angriffspunkt dar.

Zur Umsetzung des aktiven Targetings wurden zunächst PFCs hergestellt, welche einen Biotin-Avidin-Anker auf ihrer Partikeloberfläche tragen. Dazu wurden bereits biotinylierte PFCs mit NeutrAvidin inkubiert. Bei der Charakterisierung dieser PFCs fällt ihr positives Zeta-Potenzial von circa +40 mV auf (vgl. Abb. 22A). Verglichen dazu liegt das Zeta-Potenzial bei biotinylierten PFCs ohne NeutrAvidin-Zusatz zwischen -35 mV und -45 mV und ist damit deutlich negativer. Begründet werden kann dies durch die positive Nettoladung des NeutrAvidins bei neutralem pH-Wert. Durch die Bindung der NeutrAvidin-Moleküle an die in der Lipidschicht der PFCs befindlichen Biotin-Ketten fand möglicherweise eine Abschirmung der PFC-Oberfläche mit Neutr

Avidin statt, wodurch das positive Zeta-Potenzial zustandekommt. Diese Ergebnisse können als Bestätigung einer erfolgreichen Biotin-Avidin-Bindung an der PFC-Oberfläche gewertet werden. Beachtet man zudem die bevorzugte Phagozytose von Partikeln mit negativem Zeta-Potenzial, ist dieser Effekt beim aktiven Targeting von Vorteil, da eine Reduktion der Aufnahme durch Makrophagen weiterhin eingedämmt werden könnte. Genauso sind unspezifische Bindungen des NeutrAvidins an Oberflächenstrukturen der Nanoemulsionen zu erwägen. Eine Interaktion mit PEG-Ketten, Lipiden oder Cholesterin sind, auch wenn diese Bindungen nur schwach sind, durchaus möglich und können durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen verursacht werden. Auch das Zeta-Potenzial der nicht-biotinylierten PFCs, welche mit NeutrAvidin inkubiert wurden, liegt mit etwa +38 mV im positiven Bereich. An diese soll das NeutrAvidin aufgrund des fehlenden Biotins nicht binden. Bezugnehmend darauf könnte dies bedeuten, dass das NeutrAvidin nicht aus der Suspension ausgewaschen wurde oder unspezifisch gebunden hat, sodass dies in einer Positivierung des Zeta-Potenzials nicht-biotinylierter PFCs resultiert. Man kann in dem Fall von überschüssig vorhandenem NeutrAvidin keine Aussage darüber machen, ob es tatsächlich an die biotinylierten Emulsionen gebunden hat oder frei in der Probe vorliegt. Eine unspezifische Bindung des NeutrAvidins an nicht-biotinylierte PFCs kann somit nicht ausgeschlossen werden und würde diese als Negativkontrolle weniger geeignet machen. In der durchflusszytometrischen Untersuchung lässt sich weder für 0 mol% PFCs noch für 0,1 mol% PFCs eine suffiziente Partikelaufnahme feststellen (vgl. Abb. 22C). In Anbetracht dessen wird die direkte Bindung von NeutrAvidin an biotinylierte PFCs als nicht zielführend bewertet und nicht ferner untersucht.

Hauptziel der Arbeit war die CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Ansteuerung durch eine *in vitro* induzierte Biotin-Avidin-Bindung zwischen Zielzellen und PFCs. Dazu wurden mit A488- sowie mit Cfl.-markierte PFCs mit biotinylierten Antikörpern markiert und NeutrAvidin sowie biotinylierte PFCs mit der Zellsuspension inkubiert. In der Durchflusszytometrie konnte überprüft werden, ob zellspezifische Signale für das jeweilige PFC vorhanden sind, was einer Markierung der Zellen entspricht. Die Umsetzung eines Targetings über die Avidin-Biotin-Kopplungsstrategie konnte bereits von Wang *et al.* demonstriert werden: Hier wurden Targeting-PFCs mit Biotin funktionalisiert und anschließend mit Neutravidin beschichtet, um biotinylierte Antikörper zu koppeln. Diese Antikörper banden spezifisch an aktivierte Thrombozyten und ermöglichten auf diesem Weg deren gezielte PFC-Markierung für die ¹⁹F-MRT.¹³² Auch Sharma *et al.* konnten die Biotin-Avidin-Kopplung für Targeting-Zwecke nutzen. Diese Studie validiert die Biokonjugation von biotinyliertem Holotransferrin und biotinyliertem Anti-CD71-Antikörper an Avidin-konjugierte Calcium-Phosphosilikat-Nanokompositpartikel (CPNPs) zur gezielten Ansteuerung von Transferrin-Rezeptoren auf Brustkrebszellen.¹⁰⁹ Nun stellt sich die Frage, wie nach ähnlichem Prinzip eine spezifische Ansteuerung von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen erreicht werden kann. Im T-Zell-Targeting wurden bereits Methoden etabliert, welche sich nicht der Avidin-Biotin-Bindung bedienen, beispielsweise mittels Konjugierung von Nanosystemen mit anti-CD4-Peptiden.¹¹⁰ Die Forschung bezüglich selektivem T-Zell-Targeting über die Biotin-Avidin-Wechselwirkung ist jedoch begrenzt. Dinauer *et al.* beispielsweise nutzten die Avidin-Biotin-Technologie, um biotinylierte CD3-Antikörper an mit NeutrAvidin-konjugierte NPs zu koppeln und wiesen damit die effektive und zellspezifische Internalisierung der Nanopartikel in CD3-exprimierende T-Zellen nach.¹¹¹ Die Antikörper wurden dabei direkt an die NP-Oberfläche konjugiert.

Die Inkubation humaner CD4⁽⁺⁾ T-Zellen mit biotinylierten ^{Biotin.A488}-PFCs liefert schlussendlich folgende Ergebnisse: Das Aufnahmeverhalten der Zellen zeigt, dass die Partikelinkorporation beziehungsweise Adhäsion der PFCs weitgehend unabhängig von der Biotinylierung der Emulsionen stattfindet. Vor allem für die myeloiden Zellen geschieht dies offenbar auf Grundlage unspezifischer Phagozytose. Bei Nutzung der biotinylierten PFCs ist die MFI für die CD4⁽⁺⁾ T-Zellen nur unbedeutend höher als bei Nutzung der nicht-biotinylierten. Anders sieht es beim aktiven Targeting mit ^{Biotin.Cfl.}-PFCs aus. Das starke Fluoreszenzsignal der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen nach Inkubation mit biotinylierten PFCs, wie es hier zu sehen ist (vgl. Abb. 23A), spricht für eine spezifische Markierung dieser. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass dies auf die hier induzierte Biotin-Avidin-Bindung zwischen PFCs und Zellen zurückzuführen ist. Gleichzeitig deutet die im Vergleich dazu niedrigere PFC-Aufnahme durch die Neutrophilen und die Monozyten auf eine Unterdrückung ihrer phagozytosebedingten Aufnahme hin. Dennoch müssen die Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Sie erklären nicht die im Vergleich zu den anderen Populationen hohe MFI der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen bei

Nutzung der nicht-biotinylierten PFCs, welche keine Biotin-Avidin-Bindung verursachen können. Bei Markierung der Zellen durch die Avidin-Biotin-Interaktion wären bei Verwendung der 0 mol% PFCs sehr niedrige Fluoreszenzsignale der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zu erwarten, da das Fehlen des Biotins in den PFCs eine spezifische Bindung dieser an die Zellen verhindert. Gleichmaßen wichtig ist die Beobachtung, dass quantitativ nur sehr wenige Lymphozyten als FITC+ erkannt werden. Es ist zu vermuten, dass ein Teil der CD4⁽⁺⁾ T-Zellen nicht markiert worden ist und sich unter den als CD4⁽⁻⁾ erkannten Lymphoiden befindet. Wie in Abb. 16B dargestellt, emittieren die hier verwendeten PFCs ein vergleichsweise niedriges Fluoreszenzsignal. Infolge von Fluoreszenzlöschung (engl. *Quenching*), beispielsweise induziert durch Komplexbildung mit oder Energieübertragung auf sogenannte Quencher-moleküle, kann es zur Verringerung der Fluoreszenzintensität fluoreszierender Stoffe kommen.¹¹² Dieses *Quenching* kann die Detektion tatsächlich markierter Zellen in der Durchflusszytometrie erschweren oder gar unmöglich machen.

Die Aufnahmeprozesse werden möglicherweise auch durch den Biotin-Anteil der PFCs initiiert. Die biotinylierten PFCs wurden vor dem aktiven Targeting im passiven Targeting, also ohne den Zusatz von NeutrAvidin, getestet. Dabei zeigt sich, dass die Inkubation mit 0,1 mol% Biotin-PFCs geringfügig höhere MFI-Werte der Myeloiden (Neutrophilen und Monozyten) erzeugt. Resümierend deuten die Ergebnisse auf eine tendenziell bevorzugte passive Aufnahme biotinylierter PFCs durch Monozyten und Neutrophilen hin. Eine Biotin-Avidin-Interaktion kann für dieses Ergebnis nicht verursachend sein, da NeutrAvidin in diesem Versuch nicht zum Einsatz gekommen ist. Auffällig ist auch die hohe Partikelaufnahme trotz PEGylierung der PFCs. Diese Erkenntnisse müssen bei der Analyse der PFC-Aufnahme im aktiven Targeting beachtet werden. Der Mechanismus der Biotinaufnahme in peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) wird in erster Linie durch den natriumabhängigen Multivitamintransporter *SMVT (Sodium Dependent Multivitamin Transporter)* reguliert.¹¹³ Dabei ist der Biotinstoffwechsel vor allem auch von dem Zellzyklus und den Teilungsstadien der Zellen abhängig und erklärt ebenfalls die bereits erwähnte hohe Aufnahmebereitschaft biotinylierter Vektoren durch Krebszellen.¹¹⁴ Es gibt zwar Hinweise darauf, dass Biotin-konjugierte Nanopartikel bevorzugt internalisiert werden¹¹⁵, jedoch lassen sich nach aktuellem Wissensstand keine definitiven Aussagen hierzu treffen. Weitere Studien sind erforderlich, um die Bedeutung der Biotinylierung von Nanosystemen für das Aufnahmeverhalten von Zellen genauer einzuordnen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das aktive Targeting mit den hier verwendeten ^{Biotin-Cf1}-PFCs durchaus Erfolge erzielt, die Methodik aber dennoch revidiert und optimiert werden sollte, um in Zukunft eindeutigere Ergebnisse zu erhalten. Es werden über diesen Weg nämlich verhältnismäßig wenige CD4⁽⁺⁾ T-Zellen tatsächlich markiert, somit scheint die Bindung über Biotin und NeutrAvidin

nicht immer umsetzbar zu sein. Was aus den Versuchen nicht hervorgeht, ist, woran die Biotin-Avidin-Kopplung scheitert. Zum einen könnte es an einer Störung der Bindung von NeutrAvidin an die CD4-Antikörper liegen, zum anderen lässt sich eine Störung in der Kopplung der PFCs an die Biotin-NeutrAvidin-Brücke auf der Zelloberfläche vermuten. Gegebenenfalls kommt es, bedingt durch seine Größe und Struktur, zur sterischen Hinderung der Bindung des NeutrAvidins an Biotin. Insbesondere bei einer hohen Dichte von NeutrAvidin auf der Oberfläche kann es zu Einschränkungen in der Zugänglichkeit kommen. Auch eine unzureichende NeutrAvidin-Sättigung könnte die suffiziente Bindung verhindern. Da in den Versuchen aber NeutrAvidin titriert wurde und dabei kein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Partikelinkorporation beobachtet werden konnte, erscheint dies unwahrscheinlich. Letzteres spricht ebenfalls gegen eine Sättigung von NeutrAvidin vor Zugabe der PFCs. In dem Fall hätte nämlich ein Effekt der Titration auf die Partikelaufnahme festgestellt werden müssen. Obwohl die Nanopartikel PEGyliert sind und deglykolisiertes NeutrAvidin verwendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass unspezifische Bindungen und Interaktionen der Partikel mit anderen Proteinen oder Zellen die spezifische Bindung an die T-Zellen beeinträchtigen. Dies könnte zu einer verminderten Zielgerichtetheit und Effizienz der Bindung führen. Dazu sollte aber nochmals betont werden, dass die nahezu neutrale Ladung von NeutrAvidin unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindern müsste.¹⁰⁷ Eine unzureichende Biotinylierung der PFCs als Ursache für dieses Phänomen ist auszuschließen, da diese für sowohl ^{Biotin.Cf.}PFCs als auch ^{Biotin.A488}-PFCs geprüft worden ist. Dazu erfolgte die Bindung der PFCs an Avidin-Beads und eine anschließende Überprüfung des Fluoreszenz- und des Fluorsignals. Die MRT-Bilder zeigen eindeutig eine verstärkte Anreicherung der biotinylierten Partikel im Agarosegel, sodass im Vergleich zu den Proben, die nicht-biotinylierte PFCs erhielten, höhere SNR-Werte detektiert werden. Letztere Beobachtung ist auch auf die Fluoreszenzsignale der Proben übertragbar (vgl. Abb. 19A/20A). Anhand der Daten lässt sich nicht nur auf eine erfolgreiche Biotinylierung der 0,1 mol% PFCs, sondern auch auf eine funktionsfähige Biotin-Avidin-Interaktion schließen. Die Höhe des gewählten Biotin-Anteils spielt eine bedeutende Rolle in der Bildgebung. Ein Biotin-Anteil von 0,1 mol% erzeugt im Vergleich zu einem Anteil von 0,01 mol% ein deutlich stärkeres Signal in der MRT (vgl. Abb. 19C/D), was auf eine höhere Anreicherung der PFCs im Agarose-Gel zurückzuführen ist. Im Targeting sollte demnach ein höherer Biotinanteil ebenso zu einer besseren Detektion markierter Zellen führen.⁵¹

5.5. Schlussfolgerungen

Der hier im Fokus stehende Gesichtspunkt ist die Biotin-Avidin-Kopplung. Es ist festzuhalten, dass eine erfolgreiche Biotinylierung der PFCs nachgewiesen werden kann, ebenso wie deren Bindung an Avidin. Überdies konnten $CD4^{(+)}$ T-Zellen nachweislich mit biotinylierten Anti-CD4-Antikörpern markiert werden. Besonders bei Nutzung der $^{Biotin.Cfl.PFCs}$ lässt sich ein erfolgreiches Targeting der PFCs feststellen. Vergleicht man die Aufnahme biotinylierter $^{A488.PFCs}$ und $^{Cfl.PFCs}$, zeigt sich, dass $^{Cfl.PFCs}$ durch die $CD4^{(+)}$ besser aufgenommen werden als durch die anderen Zelltypen, was für die $A488$ -markierten PFCs weniger deutlich darstellbar ist. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich $^{Cfl.PFCs}$ für die Biotin-Avidin-gestützte Ansteuerung der Zellen besser eignen als $^{A488.PFCs}$. Auch wenn die beschriebene Methode noch in ihren Anfängen steht, kann hier gezeigt werden, dass eine spezifische Markierung von $CD4^{(+)}$ T-Zellen mit biotinylierten PFCs über die Avidin-Biotin-Wechselwirkung möglich ist. Es handelt sich hierbei um eine vielversprechende Methode, welche, in Anbetracht der nicht klar einzuordnenden Ergebnisse, jedoch zukünftig weiterentwickelt werden muss. Trotz nachgewiesener erfolgreicher Biotinylierung der PFCs und ihrer Bindung an Avidin-Beads sollte demgemäß eine Anpassung der PFC-Architektur in Erwägung gezogen werden. Eine mögliche Optimierung besteht in der Thiolierung der Nanopartikeloberfläche mit anschließender kovalenter Kopplung an Maleimid-modifiziertes NeutrAvidin.¹²⁵ Dieser Ansatz könnte den Versuchsaufbau vereinfachen und potenzielle Störfaktoren, welche im Rahmen der Auswertung nicht vollständig analysiert werden konnten, beseitigen.

Über die Erkenntnisse des aktiven Targetings hinaus konnte im passiven Targeting eine präferierte Aufnahme von Nanopartikeln durch Monozyten bestätigt werden. In diesem Kontext zeigt sich außerdem erneut, dass die PEGylierung zur Reduktion der konkurrierenden Nanopartikelaufnahme durch Phagozyten durchaus sinnvoll und weiterhin ein nicht zu vernachlässigender Bestandteil in der Entwicklung eines aktiven Targetings ist.

5.6. Optimierung des Targetings und Ausblick

Zur Verbesserung der Ansteuerung der Zielzellen in den beschriebenen Versuchen sollte das Targeting in seinem Aufbau verbessert werden. Dazu können verschiedene Punkte aufgearbeitet werden.

Die qualitativen Eigenschaften der Emulsionen sind ein ausschlaggebender Faktor für ihre Funktion und Nutzbarkeit in der Bildgebung. Dazu gehört nicht nur die Partikelgröße, welche die zelluläre Aufnahme und Adhäsion beeinflusst, sondern auch der Perfluorkarbon-Anteil und die Qualität des

Fluoreszenzfarbstoffes. Ein bekanntes Problem stellt das oben beschriebene *Quenching* von Fluoreszenzfarbstoffen dar. Dieses kann durch Verwendung niedrigerer Temperaturen dezimiert werden. Außerdem sollten Substanzen, die als *Quencher* wirken, identifiziert werden.¹¹⁶

Für zukünftige Arbeiten wäre es sinnvoll, auch die magnetische Zellseparation bzw. das *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)* einzusetzen. Diese Technik ermöglicht die Markierung und Separierung von Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker mit magnetischen *Beads* durch ein Magnetfeld¹¹⁷, somit also auch eine gezielte Isolation von Zellpopulationen wie CD4⁽⁺⁾ T-Zellen. Hierdurch könnte die Aufnahme der PFCs durch CD4⁽⁺⁾ T-Zellen gezielt untersucht werden, ohne dass konkurrierende Zellen die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Zusammenhang darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Eisen Fluoreszenzsignale quenchen und die durchflusszytometrische Analyse somit beeinträchtigen kann.¹¹⁸

Zur Auflösung weiterer möglicher Störfaktoren sollte die Struktur des Targetings überarbeitet werden. Dazu gehört auch die Kopplung von NeutrAvidin an die Zielzellen und an PFCs. Es sollte in Betracht gezogen werden, mit NeutrAvidin- und Biotin-Analoga zu arbeiten. Hier ist zum Beispiel Bradavidin II zu nennen, welches eine vergleichbare Affinität zu Biotin zeigt und zudem weniger immunogen ist als Avidin. Analoga zu Biotin wie strep-tag, ein Peptid, wurden bereits in der Nanotechnologie eingesetzt und könnten alternativ in Erwägung gezogen werden.¹¹⁹ Zudem könnte Avidin direkt in die Hülle der Nanopartikel eingebaut werden, sodass weniger Material und Arbeitsschritte nötig sind und weniger Wechselwirkungen auf das Ergebnis Einfluss nehmen können. Umsetzbar ist dies beispielsweise über die Funktionalisierung der PFCs mit Maleimid-Gruppen sowie durch die Anbringung von Thiol-Gruppen an Avidin-Moleküle zur Initiierung einer Thiol-Maleimid-Reaktion. Diese Reaktion ist sehr selektiv, sodass das Avidin kovalent an die PFC-Oberfläche gebunden werden könnte. Des Weiteren kann die Oligomerisierung der tetrameren Avidine die biologische Funktion des Fusionspartners verändern und sich dessen Molekulargewicht erhöhen.¹¹⁹ Monomere und dimere Avidine wie z. B. Rhizavidin könnten dementsprechend optimaler für Markierungszwecke sein.

Bisher beschriebene Vorgehensweisen erlauben zwar eine Beurteilung der Akkumulation von T-Zellen *in vivo*, dennoch ist eine Markierung mittels ansteuernder Biomarker wünschenswert, welche die Isolierung der Zellen vor Injektion nicht voraussetzt. Auf diese Weise wäre die natürliche Migration und Verteilung im Körper nachvollziehbar, ohne die Beschaffenheit der Zellen vorher *ex vivo* durch Markierung mit Farbstoffen und Nanopartikeln manipulieren zu müssen. Interessant sind daher ebenfalls Methoden, bei welchen zellpenetrierende Peptide zum Einsatz kommen. Zellpenetrierende Peptide, auch *Cell-penetrating peptides* genannt (*CPPs*) sind kurze Peptide, die in

der Lage sind, Zellmembranen zu durchdringen und dadurch verschiedene Moleküle wie Proteine, Nukleinsäuren, Liposomen oder Medikamente in Zellen zu transportieren. Darunter ist z. B. das HIV-1 *TAT* (*transactivator of transcription*) zu nennen. Dieses Peptid wird durch den HI-Virus codiert und spielt eine wichtige Rolle in der Förderung der zellulären Aufnahme von Makromolekülen.¹²⁰ Sein genauer Wirkmechanismus ist teilweise noch ungeklärt. Insbesondere seine geringe Zytotoxizität macht es aber für die Forschung sehr attraktiv. Das Peptid kann über alle möglichen Zugangswege (intravenös, subkutan, intramuskulär, transdermal oder auch mukosal) zugeführt werden. Allerdings hat das Peptid eine geringe Zellspezifität, was bedeutet, dass es mit weiteren Peptiden konjugiert werden muss, um eine gezielte Ansteuerung spezifischer Zelltypen zu gewährleisten. Diese Konjugation erhöht unvermeidlich den Aufwand, die Kosten und die Komplexität der Anwendung. In (prä-)klinischen Studien werden *CPPs* bereits in großem Umfang zur Verabreichung von Therapeutika, Kontrastmitteln und *CPP/Cargo*-Komplexen zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken verschiedener Krankheiten eingesetzt.¹²¹ Bislang sind jedoch noch keine *CPP* oder *CPP/Cargo*-Komplexe von der *US Food and Drug Administration (FDA)* zugelassen. Dennoch hat der Einbau von *CPPs* in PFCs das Potenzial, die aktive Ansteuerung von CD4⁽⁺⁾ T-Zellen zu erleichtern. Zunächst erfolgt dabei die gezielte Ansprache der T-Zellen durch aktives Targeting, woraufhin das *CPP* die Translokation der Nanopartikel durch die Zellmembran initiiert. Eine solche Strategie erweitert das Targeting dahingehend, dass nicht nur eine Oberflächenmarkierung der Zellen über Konjugationsmechanismen wie die Biotin-Avidin-Interaktion erfolgt, sondern auch eine intrazelluläre Markierung erreicht wird. Auf diese Weise können außerdem Phagozytose- und Endozytosewege umgangen werden, was eine effizientere Zellinteraktion ermöglicht. Diese Methodik konnten Hingorani *et al.* bereits demonstrieren: In ihrer Arbeit produzierten sie Perfluorkarbon-Nanoemulsionen und modifizierten diese mit *CPP*-Phospholipid- oder *CPP*-Ploxadamer-Konjugaten zur Ansteuerung von T-Zellen. Der Einbau von *TAT* in die Partikel bewirkte eine vier- bis achtfache Steigerung der Zellbeladung von T-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden unmodifizierten Nanoemulsionen, dazu ein circa achtmal stärkeres Signal der Zellen in der ¹⁹F-MRT. Zudem konnten über phänotypische Untersuchungen gezeigt werden, dass die Zellen trotz Konjugation mit *TAT* unverändert blieben.¹²²

Über diese Aspekte hinaus können weitere Oberflächenmarker genutzt werden, um CD4⁽⁺⁾ T-Zellen anzusteuern. Dazu gehört z. B. CD28, welches sich hauptsächlich auf naiven CD4⁽⁺⁾ T-Zellen findet. Auch Subtypen-spezifische Liganden wie CD40L, das primär von TH2-Zellen exprimiert wird, kommen in Frage. Die Ansteuerung von mehr als einem Liganden kann die Spezifität und Genauigkeit des Targetings erhöhen.

Sobald ein eindeutiges CD4⁽⁺⁾ T-Zell-Targeting *in vitro* etabliert ist, sollten vor allem Versuche an Modellen durchgeführt werden, welche die strukturellen und funktionellen Begebenheiten humaner Gewebe widerspiegeln. *In vivo* kommen nämlich zahlreiche Komponenten hinzu, welche das Targeting beeinflussen. Dazu gehören z. B. die Blutstromgeschwindigkeit, Temperatur, eine höhere Zellvariabilität, pathologische Veränderungen der Blutzusammensetzung, Inflammation oder auch atherosklerotische Veränderungen. Für dieses Vorhaben bieten sich zum Beispiel *Organ-on-a-Chip* Modelle an. Als *Organ-on-a-Chip* werden synthetische 3D-Mikrofluidik-Modelle von Zellkulturen auf einem integrierten Biochip bezeichnet.¹²³ Verschiedene fluidische und chemische Parameter wie Durchflussrate, Druck, Sauerstoff und pH-Wert können in diesem Modell angepasst werden, sodass die Bedingungen in der Kultur kontrollierbar sind. Sie simulieren Aktivitäten und physiologische Reaktionen der Organe und finden vor allem in der Arzneimitteltestung Anwendung. Ziel ist es dabei nicht, ganze Gewebe im entsprechenden Maßstab darzustellen. Die Technik konzentriert sich vorrangig auf die Nachbildung der organotypischen Zellarchitektur und Zellfunktionalität, der extrazellulären 3D-Matrix und nicht zuletzt biochemischer und biophysikalischer Faktoren in kleinerem Maßstab.¹²⁴

6. Literaturverzeichnis

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001 Jun 2;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. PMID: 11403834.
2. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):158-175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
3. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020 Jan 24;15:123-147. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31530089; PMCID: PMC7176483.
4. Lameijer MA, Tang J, Nahrendorf M, Beelen RH, Mulder WJ. Monocytes and macrophages as nanomedicinal targets for improved diagnosis and treatment of disease. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Jul;13(6):567-80. doi: 10.1586/14737159.2013.819216. PMID: 23895127; PMCID: PMC4110962.
5. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*. 2013 Nov;33(6):479-92. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.001. PMID: 24161035; PMCID: PMC3820029.
6. McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F. *Introduction to the Immune System. Methods Mol Biol*. 2019;2024:1-24. Doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1. PMID: 31364040.
7. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul 7;10(7):1274-81. doi: 10.2215/CJN.10031014. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25845377; PMCID: PMC4491295.
8. Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev*. 2021 Sep;303(1):72-82. doi: 10.1111/imr.13016. Epub 2021 Aug 15. PMID: 34396546.
9. Kumar BV, Connors T, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*. 2018;48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
10. Zúñiga-Pflücker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):67-72. doi: 10.1038/nri1257. PMID: 14704769.
11. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-1569. doi:10.1182/blood-2008-05-078154
12. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-2357.
13. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):811-816. doi:10.1038/nri2654

14. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135. doi:10.1155/2012/925135
15. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Oct 1;10(10):a030338. doi: 10.1101/cshperspect.a030338. PMID: 28847903; PMCID: PMC6169815.
16. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2020 Apr 26;38:705-725. doi: 10.1146/annurev-immunol-103019-085803. PMID: 32340571.
17. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. 2014;85(1):36-42. doi:10.1002/cyto.a.22348
18. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;30(5):646-55. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001. PMID: 19464987.
19. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25(4):305-312. doi:10.1016/j.smim.2013.10.009
20. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 2009 Mar 13;323(5920):1488-92. doi: 10.1126/science.1169152. PMID: 19286559.
21. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6725-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6725. PMID: 17513718.
22. Santos-Zas I, Lemarié J, Tedgui A, Ait-Oufella H. Adaptive Immune Responses Contribute to Post-ischemic Cardiac Remodeling. *Front Cardiovasc Med*. 2019;5:198. doi:10.3389/fcvm.2018.00198
23. Sharir R, Semo J, Shimoni S, et al. Experimental Myocardial Infarction Induces Altered Regulatory T Cell Hemostasis, and Adoptive Transfer Attenuates Subsequent Remodeling. Lees JR, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e113653. doi:10.1371/journal.pone.0113653
24. Hofmann U, Frantz S. Role of T-cells in myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016;37(11):873-879. doi:10.1093/eurheartj/ehv639
25. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol*. 2020;11:1142. doi:10.3389/fimmu.2020.01142
26. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
27. Grover P, Goel PN, Greene MI. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol*. 2021;12:750542. doi:10.3389/fimmu.2021.750542
28. Choo EH, Lee JH, Park EH, et al. Infarcted Myocardium-Primed Dendritic Cells Improve Remodeling and Cardiac Function After Myocardial Infarction by Modulating the Regulatory T Cell and Macrophage Polarization. *Circulation*. 2017;135(15):1444-1457. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023106

29. Rieckmann M, Delgobo M, Gaal C, et al. Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses. *J Clin Invest.* 129(11):4922-4936. doi:10.1172/JCI123859
30. Bansal SS, Ismahil MA, Goel M, Zhou G, Rokosh G, Hamid T, Prabhu SD. Dysfunctional and Proinflammatory Regulatory T-Lymphocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling in Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2019 Jan 8;139(2):206-221. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036065. PMID: 30586716; PMCID: PMC6322956.
31. Berezin AE, Berezin AA. Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. *Dis Markers.* 2020 Jun 12;2020:1215802. doi: 10.1155/2020/1215802. PMID: 32626540; PMCID: PMC7306098.
32. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Oct 1;2014(10):pdb.top071795. doi: 10.1101/pdb.top071795. PMID: 25275114; PMCID: PMC4711767.
33. Thureau SR, Mempel TR, Flügel A, Diedrichs-Möhning M, Krombach F, Kawakami N, Wildner G. The fate of autoreactive, GFP+ T cells in rat models of uveitis analyzed by intravital fluorescence microscopy and FACS. *Int Immunol.* 2004 Nov;16(11):1573-82. doi: 10.1093/intimm/dxh158. Epub 2004 Sep 6. PMID: 15351788.
34. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40. PMID: 29512141; PMCID: PMC5939936.
35. Yaghoubi SS, Campbell DO, Radu CG, Czernin J. Positron Emission Tomography Reporter Genes and Reporter Probes: Gene and Cell Therapy Applications. *Theranostics.* 2012;2(4):374-391. doi:10.7150/thno.3677
36. Islam A, Pishesha N, Harmand TJ, et al. Converting an Anti-Mouse CD4 Monoclonal Antibody into an scFv Positron Emission Tomography Imaging Agent for Longitudinal Monitoring of CD4⁺ T Cells. *J Immunol.* 2021;207(5):1468-1477. doi:10.4049/jimmunol.2100274
37. Yaghoubi SS, Jensen MC, Satyamurthy N, et al. Non-Invasive Detection of Therapeutic Cytolytic T Cells with [18F]FHBG Positron Emission Tomography in a Glioma Patient. *Nat Clin Pract Oncol.* 2009;6(1):53-58. doi:10.1038/ncponc1278
38. Bannas P, Graumann O, Peldschus K, et al. Qualitative und quantitative Analysen von T-Zellen in einem klinischen 3T MR-Tomographen durch eine neue Antikörper basierte Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb Röntgenstrahlen Bildgeb Verfahr.* 2009;181(3):A1. doi:10.1055/s-0029-1208327
39. Tirota I, Dichiarante V, Pigliacelli C, et al. 19F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chem Rev.* 2015;115(2):1106-1129. doi:10.1021/cr500286d
40. Grover VP, Tognarelli JM, Crossey MM, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJ. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol.* 2015 Sep;5(3):246-55. doi: 10.1016/j.jceh.2015.08.001. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26628842; PMCID: PMC4632105.
41. Ahrens ET, Bulte JWM. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):10.1038/nri3531. doi:10.1038/nri3531

42. Güden-Silber T, Temme S, Jacoby C, Flögel U. Biomedical 19F MRI Using Perfluorocarbons. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1718:235-257. doi:10.1007/978-1-4939-7531-0_14
43. Flögel U, Ding Z, Hardung H, et al. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by 19F magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2008;118(2):140-148. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890
44. Jacoby C, Borg N, Heusch P, et al. Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by 19F MRI in vivo. *Magn Reson Mater Phys Biol Med*. 2014;27(1):101-106. doi:10.1007/s10334-013-0391-6
45. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000 Oct;11 Suppl 2:S81-91. doi: 10.1016/s0928-0987(00)00166-4. PMID: 11033430.
46. Clemons TD, Singh R, Sorolla A, Chaudhari N, Hubbard A, Iyer KS. Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy. *Langmuir*. 2018;34(50):15343-15349. doi:10.1021/acs.langmuir.8b02946
47. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol*. 2019;71(8):1185-1198. doi:10.1111/jphp.13098
48. Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther*. 2019;34(1). doi:10.1515/dmpt-2018-0032
49. Thorek DLJ, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng*. 2006;34(1):23-38. doi:10.1007/s10439-005-9002-7
50. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(2):101-124. doi:10.1038/s41573-020-0090-8
51. Jain A, Cheng K. The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2017;245:27-40. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.016
52. León-Del-Río A. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease. *J Inherit Metab Dis*. 2019 Jul;42(4):647-654. doi: 10.1002/jimd.12073. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30746739.
53. Peterson CT, Rodionov DA, Osterman AL, Peterson SN. B Vitamins and Their Role in Immune Regulation and Cancer. *Nutrients*. 2020 Nov 4;12(11):3380. doi: 10.3390/nu12113380. PMID: 33158037; PMCID: PMC7693142.
54. Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb;35(1):36-46. doi: 10.1002/biof.8. PMID: 19319844; PMCID: PMC4757853.
55. González M, Argaraña CE, Fidelio GD. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng*. 1999 Dec 31;16(1-4):67-72. doi: 10.1016/s1050-3862(99)00041-8. PMID: 10796986.

56. Rybak JN, Scheurer SB, Neri D, Elia G. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics*. 2004 Aug;4(8):2296-9. doi: 10.1002/pmic.200300780. PMID: 15274123.
57. Lesch HP, Kaikkonen MU, Pikkarainen JT, Ylä-Herttuala S. Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(5):551-564. doi:10.1517/17425241003677749
58. Kalofonos HP, Rusckowski M, Siebecker DA, et al. Imaging of Tumor in Patients with Indium-111-Labeled Biotin and Streptavidin-Conjugated Antibodies: Preliminary Communication. *J Nucl Med*. 1990;31(11):1791-1796.
59. Walker L, Kulomaa MS, Bebok Z, et al. Development of drug targeting based on recombinant expression of the chicken avidin gene. *J Drug Target*. 1996;4(1):41-49. doi:10.3109/10611869609046259
60. Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2007;8(8):573-587. doi:10.1038/nrg2141
61. Huang B, Abraham WD, Zheng Y, Bustamante López SC, Luo SS, Irvine DJ. Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(291):291ra94. doi:10.1126/scitranslmed.aaa5447
62. Moro M, Pelagi M, Fulci G, et al. Tumor Cell Targeting with Antibody-Avidin Complexes and Biotinylated Tumor Necrosis Factor α 1. *Cancer Res*. 1997;57(10):1922-1928.
63. Grapentin C, Mayenfels F, Barnert S, et al. *Optimization of Perfluorocarbon Nanoemulsions for Molecular Imaging by 19F MRI.*; 2014.
64. Temme S, Grapentin C, Quast C, et al. Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by 19F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation*. 2015;131(16):1405-1414. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010962
65. Connot J, Silva JM, Fernandes JG, et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem*. 2014;2:105. doi:10.3389/fchem.2014.00105
66. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;99(Pt A):28-51. doi:10.1016/j.addr.2015.09.012
67. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(36):6288-6308. doi:10.1002/anie.200902672
68. Schöttler S, Becker G, Winzen S, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol*. 2016;11(4):372-377. doi:10.1038/nnano.2015.330
69. Polydispersity Index - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed October 14, 2024. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/polydispersity-index>
70. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Springer; 2018. doi:10.1007/978-3-662-56004-4

71. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol.* 2020;11:1066. doi:10.3389/fimmu.2020.01066
72. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 2016;44(3):463-475. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026
73. Zelepukin IV, Shevchenko KG, Deyev SM. Rediscovery of mononuclear phagocyte system blockade for nanoparticle drug delivery. *Nat Commun.* 2024;15:4366. doi:10.1038/s41467-024-48838-5
74. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):133-149.
75. Trotter J, Pantel AR, Teo BKK, et al. Positron Emission Tomography (PET)/Computed Tomography (CT) Imaging in Radiation Therapy Treatment Planning: A Review of PET Imaging Tracers and Methods to Incorporate PET/CT. *Adv Radiat Oncol.* 2023;8(5). doi:10.1016/j.adro.2023.101212
76. Wallyn J, Anton N, Akram S, Vandamme TF. Biomedical Imaging: Principles, Technologies, Clinical Aspects, Contrast Agents, Limitations and Future Trends in Nanomedicines. *Pharm Res.* 2019;36(6):78. doi:10.1007/s11095-019-2608-5
77. Srikar R, Upendran A, Kannan R. Polymeric nanoparticles for molecular imaging. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2014;6(3):245-267. doi:10.1002/wnan.1259
78. Bouvain P, Temme S, Flögel U. Hot spot 19F magnetic resonance imaging of inflammation. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2020;12(6):e1639. doi:10.1002/wnan.1639
79. Straub T, Nave J, Bouvain P, et al. MRI-based molecular imaging of epicardium-derived stromal cells (EpiSC) by peptide-mediated active targeting. *Sci Rep.* 2020;10:21669. doi:10.1038/s41598-020-78600-y
80. Ebner B, Behm P, Jacoby C, et al. Early Assessment of Pulmonary Inflammation By 19F MRI In Vivo. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2010;3(2):202-210. doi:10.1161/CIRCIMAGING.109.902312
81. Chen J, Pan H, Lanza GM, Wickline SA. Perfluorocarbon Nanoparticles for Physiological and Molecular Imaging and Therapy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(6):466-478. doi:10.1053/j.ackd.2013.08.004
82. Ahrens ET, Zhong J. In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection. *NMR Biomed.* 2013;26(7):860-871. doi:10.1002/nbm.2948
83. Jacoby C, Temme S, Mayenfels F, et al. Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by 19F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. *NMR Biomed.* 2014;27(3):261-271. doi:10.1002/nbm.3059
84. Janjic JM, Ahrens ET. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009;1(5):492-501. doi:10.1002/wnan.35
85. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res.* 2008;25(8):1815-1821. doi:10.1007/s11095-008-9562-y

86. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Controlled Release*. 2010;145(3):182-195. doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.036
87. Malkawi A, Alrabadi N, Kennedy RA. Dual-Acting Zeta-Potential-Changing Micelles for Optimal Mucus Diffusion and Enhanced Cellular Uptake after Oral Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):974. doi:10.3390/pharmaceutics13070974
88. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*. 1995;5(3):85-87. doi:10.1016/S0962-8924(00)88955-2
89. Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, et al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater*. 2019;20(1):710-724. doi:10.1080/14686996.2019.1627174
90. Caballero R, González-Gamboa I, Craig S, Steinmetz N. Linear and multivalent PEGylation of the tobacco mosaic virus and the effects on its biological properties. *Front Virol*. 2023;3. doi:10.3389/fviro.2023.1184095
91. Khutoryanskiy VV. Beyond PEGylation: Alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;124:140-149. doi:10.1016/j.addr.2017.07.015
92. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
93. Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;46(3):255-263. doi:10.1016/S0939-6411(98)00038-1
94. Li PY, Bearoff F, Zhu P, et al. PEGylation enables subcutaneously administered nanoparticles to induce antigen-specific immune tolerance. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2021;331:164-175. doi:10.1016/j.jconrel.2021.01.013
95. Hak S, Garaiova Z, Olsen LT, Nilsen AM, de Lange Davies C. The Effects of oil-in-Water Nanoemulsion Polyethylene Glycol Surface Density on Intracellular Stability, Pharmacokinetics, and Biodistribution in Tumor Bearing Mice. *Pharm Res*. 2015;32(4):1475-1485. doi:10.1007/s11095-014-1553-6
96. Henry CE, Wang YY, Yang Q, et al. Anti-PEG antibodies alter the mobility and biodistribution of densely PEGylated nanoparticles in mucus. *Acta Biomater*. 2016;43:61-70. doi:10.1016/j.actbio.2016.07.019
97. Rabanel JM, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *J Controlled Release*. 2014;185:71-87. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.017
98. Crisafulli S, Cutroneo PM, Luxi N, et al. Is PEGylation of Drugs Associated with Hypersensitivity Reactions? An Analysis of the Italian National Spontaneous Adverse Drug Reaction Reporting System. *Drug Saf*. 2023;46(4):343-355. doi:10.1007/s40264-023-01277-5
99. Bigini P, Gobbi M, Bonati M, et al. The role and impact of polyethylene glycol on anaphylactic reactions to COVID-19 nano-vaccines. *Nat Nanotechnol*. 2021;16(11):1169-1171. doi:10.1038/s41565-021-01001-3

100. Chen C, Qi J, Wang J. Anaphylaxis caused by pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract*. 2023;29(3):727-730. doi:10.1177/10781552221112323
101. Kozma GT, Shimizu T, Ishida T, Szebeni J. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;154-155:163-175. doi:10.1016/j.addr.2020.07.024
102. Shiraishi K, Yokoyama M. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. *Sci Technol Adv Mater*. 2019;20(1):324-336. doi:10.1080/14686996.2019.1590126
103. Chen H, Zhang Q. Polypeptides as alternatives to PEGylation of therapeutic agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 2024;21(1):1-12. doi:10.1080/17425247.2023.2297937
104. Grund S, Bauer M, Fischer D. Polymers in Drug Delivery—State of the Art and Future Trends. *Adv Eng Mater*. 2011;13(3):B61-B87. doi:10.1002/adem.201080088
105. Avidin, NeutrAvidin™ Biotin-binding Protein. Accessed August 1, 2024. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/A2666>
106. Regnier FE, Cho W. Chapter 13 - Affinity Targeting Schemes for Biomarker Research. In: Issaq HJ, Veenstra TD, eds. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. Academic Press; 2013:197-224. doi:10.1016/B978-0-12-394446-7.00013-3
107. Jain A, Barve A, Zhao Z, Jin W, Cheng K. Comparison of avidin, neutravidin, and streptavidin as nanocarriers for efficient siRNA Delivery. *Mol Pharm*. 2017;14(5):1517-1527. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00933
108. Park SC, Kim YM, Kim NH, et al. Targeted doxorubicin delivery based on avidin-biotin technology in cervical tumor cells. *Macromol Res*. 2017;25(9):882-889. doi:10.1007/s13233-017-5100-2
109. Sharma R, Barth BM, Altinoğlu Eİ, et al. Bioconjugation of Calcium Phosphate Nanoparticles for Selective Targeting of Human Breast and Pancreatic Cancers In Vivo. *ACS Nano*. 2010;4(3):1279-1287. doi:10.1021/nn901297q
110. Ncobeni N, Torre BG de la, Albericio F, Kruger HG, Parboosing R. Active targeting of CD4+ T lymphocytes by PEI-capped, peptide-functionalized gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2022;33(40):405101. doi:10.1088/1361-6528/ac7885
111. Dinauer N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K, von Briesen H. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials*. 2005;26(29):5898-5906. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.038
112. Lakowicz JR, ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US; 2006. doi:10.1007/978-0-387-46312-4
113. Tripathi R, Guglani A, Ghorpade R, Wang B. Biotin conjugates in targeted drug delivery: is it mediated by a biotin transporter, a yet to be identified receptor, or (an)other unknown mechanism(s)? *J Enzyme Inhib Med Chem*. 38(1):2276663. doi:10.1080/14756366.2023.2276663

114. Stanley JS, Mock DM, Griffin JB, Zempleni J. Biotin Uptake into Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Increases Early in the Cell Cycle, Increasing Carboxylase Activities,. *J Nutr.* 2002;132(7):1854-1859.
115. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry in Oral Drug Delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2016;238:176-185. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.051
116. Doose S, Neuweiler H, Sauer M. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. *ChemPhysChem.* 2009;10(9-10):1389-1398. doi:10.1002/cphc.200900238
117. Zborowski M, Chalmers JJ. Magnetic Cell Sorting. In: Burns R, ed. *Immunochemical Protocols.* Humana Press; 2005:291-300. doi:10.1385/1-59259-873-0:291
118. Kim IJ, Xu Y, Nam KH. Metal-Induced Fluorescence Quenching of Photoconvertible Fluorescent Protein DendFP. *Molecules.* 2022;27(9):2922. doi:10.3390/molecules27092922
119. Leppiniemi J, Meir A, Kähkönen N, et al. The highly dynamic oligomeric structure of bradavidin II is unique among avidin proteins. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2013;22(7):980-994. doi:10.1002/pro.2281
120. Zou L, Peng Q, Wang P, Zhou B. Progress in Research and Application of HIV-1 TAT-Derived Cell-Penetrating Peptide. *J Membr Biol.* 2017;250(2):115-122. doi:10.1007/s00232-016-9940-z
121. Xie J, Bi Y, Zhang H, et al. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. *Front Pharmacol.* 2020;11:697. doi:10.3389/fphar.2020.00697
122. Hingorani DV, Chapelin F, Stares E, Adams SR, Okada H, Ahrens ET. Cell penetrating peptide functionalized perfluorocarbon nanoemulsions for targeted cell labeling and enhanced fluorine-19 MRI detection. *Magn Reson Med.* 2020;83(3):974-987. doi:10.1002/mrm.27988
123. Wu Q, Liu J, Wang X, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online.* 2020;19(1):9. doi:10.1186/s12938-020-0752-0
124. Ma C, Peng Y, Li H, Chen W. Organ-on-a-Chip: A new paradigm for drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42(2):119-133. doi:10.1016/j.tips.2020.11.009
125. Tseng CL, Wang TW, Dong GC, et al. Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting. *Biomaterials.* 2007;28(27):3996-4005. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.006
126. Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes. Accessed December 11, 2024. <https://www.semanticscholar.org/paper/Zeta-Potential-An-Introduction-in-30-Minutes/ce38d81ee8d3f5f2a6bef221ed3e5e22b3f3378e>
127. Nienhaus F, Colley D, Jahn A, et al. Phagocytosis of a PFOB-Nanoemulsion for 19F Magnetic Resonance Imaging: First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *Molecules.* 2019;24(11):2058. doi:10.3390/molecules24112058

-
128. Becker K, Ding Z, Bouvain P, et al. Inflammatory stimuli impact on cellular uptake and biodistribution of perfluorocarbon nanoemulsions. *J Leukoc Biol*. Published online September 16, 2024;qiae199. doi:10.1093/jleuko/qiae199
 129. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):385. doi:10.3390/ijms22010385
 130. Østergaard ME, Jackson M, Low A, et al. Conjugation of hydrophobic moieties enhances potency of antisense oligonucleotides in the muscle of rodents and non-human primates. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(12):6045-6058. doi:10.1093/nar/gkz360
 131. Wada S, Yasuhara H, Wada F, et al. Evaluation of the effects of chemically different linkers on hepatic accumulations, cell tropism and gene silencing ability of cholesterol-conjugated antisense oligonucleotides. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2016;226:57-65. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.007
 132. Wang X, Temme S, Grapentin C, et al. Fluorine-19 Magnetic Resonance Imaging of Activated Platelets. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis*. 2020;9(18):e016971. doi:10.1161/JAHA.120.016971

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstgutachter, PD Dr. Sebastian Temme. Die außerordentlich gute Betreuung meiner Arbeit, die stetige Unterstützung sowie die wertvollen Ideen und Anregungen während des gesamten Prozesses sind keineswegs selbstverständlich und ich schätze sie umso mehr.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Schrader und Prof. Dr. Ulrich Flögel für die Ermöglichung bedanken, meine Dissertation am Institut für Molekulare Kardiologie zu verfassen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Patricia Kleimann, die mir insbesondere während der Durchführung des praktischen Teils meiner Arbeit immer hilfsbereit unter die Arme gegriffen hat und mit guten Ratschlägen zur Seite stand. Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des gesamten Weges unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.