

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Aufnahmemechanismen von elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln in Atherosklerose- assoziierte Monozyten und Makrophagen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Konstantin Möller  
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

## Vorwort

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Wolfram C. Poller†, Norbert Löwa†, Frank Wiekhorst, Matthias Taupitz, Susanne Wagner, **Konstantin Möller**, Gert Baumann, Verena Stangl, Lutz Trahms, and Antje Ludwig, „Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy“, J. Biomed. Nanotechnol. 12, 1–10, 2016
2. Wolfram C. Poller, Evelyn Ramberger, Philipp Boehm-Sturm, Susanne Mueller, **Konstantin Möller**, Norbert Löwa, Frank Wiekhorst, Susanne Wagner, Matthias Taupitz, Eyk Schellenberger, Gert Baumann, Karl Stangl, Verena Stangl, and Antje Ludwig, „Uptake of citrate-coated iron oxide nanoparticles into atherosclerotic lesions in mice occurs via accelerated transcytosis through plaque endothelial cells“, Nano Research. 2016-7-18, 2016
3. Wolfram Christian Poller, Melanie Pieber, Philipp Boehm-Sturm, Evelyn Ramberger, Vasileios Karamelas, **Konstantin Möller**, Moritz Schleicher, Frank Wiekhorst, Norbert Löwa, Susanne Wagner, Jörg Schnorr, Matthias Taupitz, Karl Stangl, Verena Stangl, and Antje Ludwig, „ Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice “, Nanomedicine. 14(8):2575-2586, 2018

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                         |             |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                    | <b>II</b>   |
| <b>Inhaltsverzeichnis.....</b>                                          | <b>III</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis.....</b>                                         | <b>VIII</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                       | <b>IX</b>   |
| <b>Zusammenfassung.....</b>                                             | <b>XI</b>   |
| <b>Abstract.....</b>                                                    | <b>XIII</b> |
| <b>1 Einleitung .....</b>                                               | <b>1</b>    |
| 1.1 Die Atherosklerose .....                                            | 1           |
| 1.1.1 Epidemiologie, Folgeerkrankungen und Risikofaktoren.....          | 1           |
| 1.1.2 Pathogenese .....                                                 | 1           |
| 1.1.3 Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose .....             | 4           |
| 1.2 Bildgebung der Atherosklerose .....                                 | 7           |
| 1.2.1 Invasive Bildgebung .....                                         | 7           |
| 1.2.1.1 Kathetergestützte Angiographie.....                             | 7           |
| 1.2.1.2 Thermographie .....                                             | 7           |
| 1.2.1.3 Intravaskulärer Ultraschall (IVUS).....                         | 8           |
| 1.2.1.4 Optische Kohärenztomographie.....                               | 8           |
| 1.2.2 Nicht-Invasive Bildgebung.....                                    | 8           |
| 1.2.2.1 Ultrafast Computed Tomography (UFCT) .....                      | 8           |
| 1.2.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT).....                            | 9           |
| 1.3 Eisenoxidnanopartikel in der MR-Bildgebung der Atherosklerose ..... | 10          |
| 1.3.1 VSOP-Cell-Labeling .....                                          | 12          |
| 1.4 Fragestellung der Arbeit .....                                      | 14          |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>                                    | <b>16</b>   |
| 2.1 Geräte .....                                                        | 16          |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien.....                                          | 17          |
| 2.3 Verbrauchsreagenzien .....                                          | 18          |
| 2.4 Zellmedien.....                                                     | 19          |
| 2.5 Zellkultur .....                                                    | 19          |
| 2.6 Kits .....                                                          | 19          |
| 2.7 Zytokine.....                                                       | 20          |
| 2.8 Antikörper .....                                                    | 20          |
| 2.9 VSOP .....                                                          | 20          |
| 2.10 Versuche mit Monozyten und Makrophagen .....                       | 21          |

|          |                                                                                                                |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.10.1   | Kultivierung von BMDM aus murinem Knochenmark von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen .....                        | 21        |
| 2.10.2   | Makrophagenpolarisation .....                                                                                  | 22        |
| 2.10.3   | Behandlung der Makrophagen mit VSOP .....                                                                      | 23        |
| 2.10.4   | Bestimmung von Proliferationsgeschwindigkeit und Apoptoserate von THP-1-Monozyten nach MPS-Messung .....       | 23        |
| 2.11     | Proteinbiochemische und molekularbiochemische Methoden .....                                                   | 24        |
| 2.11.1   | Photometrische Eisenbestimmung mit Phenanthrolin .....                                                         | 24        |
| 2.11.2   | RNA-Isolierung .....                                                                                           | 24        |
| 2.11.3   | Herstellung von cDNA .....                                                                                     | 24        |
| 2.11.4   | Real Time quantitative PCR .....                                                                               | 25        |
| 2.11.5   | Durchflusszytometrische Charakterisierung des Zelltyps .....                                                   | 26        |
| 2.12     | Physikalisch-technische Methoden.....                                                                          | 26        |
| 2.12.1   | Bestimmung des Eisengehalts mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) .....                                    | 26        |
| 2.13     | In Vivo-Versuche .....                                                                                         | 27        |
| 2.13.1   | Isolierung der PBMC mittels Ficoll-Gradient .....                                                              | 27        |
| 2.13.2   | Probenaufbereitung für die Elektronenmikroskopie.....                                                          | 29        |
| 2.13.3   | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....                                                                 | 30        |
| 2.13.4   | Magnetresonanztomographie in-situ und ex-vivo .....                                                            | 30        |
| 2.14     | Statistik .....                                                                                                | 31        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                                        | <b>32</b> |
| 3.1      | Aufnahme von VSOP in Makrophagen und Monozyten .....                                                           | 32        |
| 3.1.1    | Zentrifugation, Transport und MPS-Messung haben keine Auswirkungen auf die Zellvitalität .....                 | 32        |
| 3.1.2    | Die Magnetpartikelspektroskopie erlaubt eine genaue Quantifizierung des Eisengehaltes.....                     | 34        |
| 3.2      | Einfluss des Makrophagenphänotyps auf die Aufnahme von VSOP .....                                              | 39        |
| 3.2.1    | Durchflusszytometrie bestätigte die Reinheit der Makrophagenpopulation .....                                   | 39        |
| 3.2.2    | Eine Behandlung mit IFN- $\gamma$ und IL-4 führte zu einer Differenzierung der Makrophagen .....               | 39        |
| 3.2.3    | Der Makrophagenphänotyp hat keinen Einfluss auf die VSOP-Aufnahme .....                                        | 40        |
| 3.3      | Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen.....                       | 42        |
| 3.3.1    | Murine atherosklerotische Plaques zeigen eine schnelle Anreicherung von VSOP nach intravenöser Injektion ..... | 42        |

|          |                                                                                                                                                                       |              |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.3.2    | VSOP werden durch murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aufgenommen .....                                                                           | 46           |
| 3.3.3    | VSOP werden nicht durch murine Erythrozyten aufgenommen .....                                                                                                         | 49           |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                                                                                | <b>51</b>    |
| 4.1      | Synopsis der wichtigsten Ergebnisse .....                                                                                                                             | 51           |
| 4.2      | VSOP als Cell-Tracking-Marker und Eisenquantifizierung mittels Magnetpartikelspektroskopie .....                                                                      | 52           |
| 4.3      | Einfluss des Polarisationsstatus von Makrophagen auf die Aufnahme von VSOP und möglicher Aufnahmemechanismus .....                                                    | 54           |
| 4.4      | Aufnahme von VSOP in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und atherosklerotische Plaques sowie Rückschlüsse auf einen möglichen Aufnahmemechanismus ..... | 57           |
| 4.5      | Fehlerquellen und Schwierigkeiten .....                                                                                                                               | 63           |
| 4.6      | Schlussfolgerungen.....                                                                                                                                               | 64           |
| 4.7      | Ausblick.....                                                                                                                                                         | 65           |
|          | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                                                                                                                      | <b>IX</b>    |
|          | <b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>                                                                                                                              | <b>XX</b>    |
|          | <b>Curriculum Vitae .....</b>                                                                                                                                         | <b>XXIII</b> |
|          | <b>Danksagung.....</b>                                                                                                                                                | <b>XXVII</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Progress der atherosklerotischen Läsion.....                                                                                                                        | 4  |
| Abbildung 2: Schematischer Überblick der verschiedenen Makrophagenpopulationen und ihrer Zytokine und Oberflächenproteine.....                                                   | 6  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Makrophagenisolierung aus murinem Knochenmark .....                                                                                    | 22 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen des mittels Lympholyte© aufgetrennten Blutes.....                                                                 | 28 |
| Abbildung 5: Einfluss von Transport und Messung mittels Magnetpartikelspektroskope (MPS) auf die Zellproliferation von THP-1-Monozyten .....                                     | 33 |
| Abbildung 6: Einfluss der Messung mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) auf die Apoptose von THP-1-Monozyten .....                                                           | 34 |
| Abbildung 7: Vergleich der Eisenquantifizierung von Makrophagen durch Magnetpartikelspektroskopie (MPS) und photometrischer Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay. ....         | 35 |
| Abbildung 8: Vergleich der Eisenquantifizierung von Monozyten durch Magnetpartikelspektroskopie (MPS) und photometrischer Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay .....           | 36 |
| Abbildung 9: Darstellung des A5/A3-Verhältnisses über den Versuchszeitraum nach Behandlung von Makrophagen mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) .....            | 37 |
| Abbildung 10: Darstellung des A5/A3-Verhältnisses über den Versuchszeitraum nach Behandlung von Monozyten mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) .....             | 38 |
| Abbildung 11: Expression von Markergenen in verschiedenen Makrophagenphänotypen nach Behandlung der primären Makrophagen mit 100 U/ml IFN- $\gamma$ (M1) bzw. 5 U/ml IL-4 (M2).. | 40 |
| Abbildung 12: Eisengehalt pro Zelle in M1-, M2- und M0-Makrophagen nach Behandlung mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in proteinreicher Lösung (10 % FCS) .    | 41 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 13: Eisengehalt pro Zelle in M1-, M2- und M0-Makrophagen nach Behandlung mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in proteinarmer Lösung (1 % FCS).....                                                                                            | 42 |
| Abbildung 14: T2*-gewichtete in situ MRT-Aufnahmen der thorakalen Aorta von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP).....                                                              | 44 |
| Abbildung 15: T2*-gewichtete ex-situ MRT-Aufnahmen der thorakalen Aorta von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP).....                                                              | 45 |
| Abbildung 16: Untersuchung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Transmissionselektronenmikroskopie an verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen ..... | 47 |
| Abbildung 17: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der in vivo-Aufnahme von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nach intravenöser Injektion in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen.....                  | 48 |
| Abbildung 18: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung eines Endozytose-prozesses einer murinen mononukleären Zelle des peripheren Blutes (PBMC) im Rahmen der Aufnahme von very small iron oxide nanoparticles (VSOP).....                                     | 49 |
| Abbildung 19: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von Erythrozyten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. ....                                                                                  | 50 |

## **Tabellenverzeichnis**

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Verwendete Geräte.....                 | 16 |
| Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien ..... | 17 |
| Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsreagenzien .....  | 18 |
| Tabelle 4: Verwendete Zellmedien .....            | 19 |
| Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.....             | 19 |
| Tabelle 6: Verwendete Kits.....                   | 19 |
| Tabelle 7: Verwendete Zytokine .....              | 20 |
| Tabelle 8: Verwendete Antikörper .....            | 20 |
| Tabelle 9: Herstellung von cDNA .....             | 25 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                           |                                                       |
|---------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>ABCA:</b>              | <i>ATP-binding cassette, sub-family A</i>             |
| <b>ABCG:</b>              | <i>ATP-binding cassette sub-family G</i>              |
| <b>AHA:</b>               | <i>American Heart Association</i>                     |
| <b>BMDM:</b>              | <i>Bone-marrow-derived macrophage</i>                 |
| <b>CP</b>                 | Cacodylatpuffer                                       |
| <b>cDNA</b>               | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                  |
| <b>CXCL</b>               | Chemokinligand der CXC-Familie                        |
| <b>DNA</b>                | Desoxyribonukleinsäure                                |
| <b>DDSA</b>               | Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid                      |
| <b>DMP 30</b>             | 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol                 |
| <b>EDTA</b>               | Ethylendiamintetraacetat                              |
| <b>FCS</b>                | Fetales Kälberserum                                   |
| <b>FRET</b>               | Förster-Resonanzenergietransfers                      |
| <b>HDL</b>                | <i>High Density Lipoprotein</i>                       |
| <b>HUVEC</b>              | <i>Human umbilical vein endothelial cell</i>          |
| <b>ICAM</b>               | <i>Intercellular adhesion molecule</i>                |
| <b>IL</b>                 | Interleukin                                           |
| <b>IFN</b>                | Interferon                                            |
| <b>LDL</b>                | <i>Low Density Lipoprotein</i>                        |
| <b>LDLR<sup>-/-</sup></b> | LDL-Rezeptor defizient                                |
| <b>LFA</b>                | <i>Leukocyte Function-associated Antigen</i>          |
| <b>LPS</b>                | Lipopolysaccharid                                     |
| <b>MARCO</b>              | <i>Macrophage receptor with collagenous structure</i> |
| <b>MCP</b>                | <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>               |

|                               |                                                                         |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>M-CSF</b>                  | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>                             |
| <b>MHC</b>                    | Haupthistokompatibilitätskomplex                                        |
| <b>MNP</b>                    | Magnetische Nanopartikel                                                |
| <b>MPS</b>                    | Magnetpartikelspektroskopie                                             |
| <b>MRT</b>                    | Magnetresonanztomographie                                               |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b> | <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| <b>P/S</b>                    | Penicillin-Streptomycin                                                 |
| <b>PBMC</b>                   | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes                               |
| <b>PBS</b>                    | Phosphatgepufferte Salzlösung                                           |
| <b>RNA</b>                    | Ribonukleinsäure                                                        |
| <b>RPMI</b>                   | Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium                        |
| <b>RT-PCR</b>                 | Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion                         |
| <b>SPIO</b>                   | Superparamagnetisches Eisenoxid                                         |
| <b>TGF-beta</b>               | <i>Transforming growth factor beta</i>                                  |
| <b>TH1</b>                    | Typ1-T-Helferzellen                                                     |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                                            |
| <b>USPIO</b>                  | <i>Ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>                          |
| <b>VCAM</b>                   | <i>Vascular cell adhesion molecule</i>                                  |
| <b>VLA</b>                    | <i>Very late antigen</i>                                                |
| <b>VSOP</b>                   | <i>Very small iron oxide particles</i>                                  |
| <b>WHO</b>                    | Weltgesundheitsorganisation                                             |

## Zusammenfassung

Die Atherosklerose und ihre Folgen führen die weltweiten Todesursachenstatistiken an, woraus sich eine hohe gesundheitsökonomische Belastung ableiten lässt. Um eine Risikostratifizierung von atherosklerotischen Plaques zu ermöglichen ist es wichtig, Plaques mittels Bildgebung hochauflösend darzustellen und Rückschlüsse auf deren Zusammensetzung zu erhalten. Während bereits bekannt ist, dass very small iron oxide nanoparticles (VSOP) als mögliches MRT-Kontrastmittel von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen aufgenommen werden und auch eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques zeigen, waren die verantwortlichen Aufnahmemechanismen bisher nicht identifiziert worden. Daher kombinierten wir transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen, physikalisch-technische Messmethoden wie die Magnetpartikelspektroskopie (MPS) sowie magnetresonanztomographische Bildgebung in in-vitro und in-vivo Versuchen, um weitere Rückschlüsse auf den Aufnahmemechanismus von VSOP zu erhalten. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf einer möglicherweise veränderten Aufnahme innerhalb verschiedener Makrophagenphänotypen, was eine Charakterisierung vulnerabler, rupturgefährdeter Plaques ermöglichen könnte.

Durch MPS-Messungen, die eine Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP unmittelbar nach Zellkontakt zeigten, konnte auf eine zügige Interaktion der Nanopartikel mit Oberflächenstrukturen der Zellen geschlossen werden. Nach intravenöser Gabe von VSOP ließ sich MR-morphologisch in LDL-Rezeptor defizienten ( $LDLR^{-/-}$ ) Mäusen eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques an typischen Prädilektionsstellen wie der kleinen Krümmung des Arcus aortae und dem Truncus brachiocephalicus als negativer Kontrast 30 Minuten nach Partikelinjektion nachweisen. Zusätzlich konnte eine Aufnahme der Nanopartikel in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) im selben Zeitraum mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen festgestellt werden. Die postulierte Annahme einer unterschiedlichen Eisenaufnahme innerhalb verschiedener Makrophagenphänotypen konnte nicht bestätigt werden. Durch die sehr schnelle Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques konnte eine Migration von zirkulierenden, VSOP-beladenen PBMC über neovaskularisierte Plaquebereiche als Hauptaufnahmemechanismus ausgeschlossen werden. Da sich VSOP in PBMC teilweise noch 7 Tage nach Injektion nachweisen lassen, ist eine geringe VSOP-Aufnahme in Plaques über diesen Mechanismus jedoch möglich. Eine passive Aufnahme von VSOP konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, nachdem Erythrozyten als kernlose Zellen, die einer Endozytose unfähig sind, keine Aufnahme von VSOP in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten. Durch Kombination der Beobachtungen mit

bereits veröffentlichten Daten konnte der für die VSOP-Aufnahme mutmaßlich verantwortliche Hauptmechanismus als Glykosaminoglykan-abhängige Transzytose identifiziert werden.

## Abstract

Atherosclerosis and its impacts are the leading cause of death worldwide implicating an equally big economic burden on health systems. In order to stratify risks of individual plaques it is of utmost importance to be able to depict plaques with high resolution and to gain information on their composition. While it has already been shown that very small iron oxide nanoparticles (VSOP) as a possible contrast agent in MRI diagnostics are being ingested by a variety of different cell types and an enrichment in atherosclerotic plaques has been described, the mechanism of intake remained unknown. Therefore we combined transmission electron microscopy (TEM), magnet particle spectroscopy (MPS) and magnet resonance imaging (MRI) in in-vitro and in-vivo experiments in order to gain further insights into the uptake mechanism of VSOP. Particular focus was placed on possible differences in VSOP-uptake between macrophage phenotypes, which would facilitate identification of vulnerable rupture-prone plaques.

From observations in MPS-measurements, which showed a change of magnetic behavior immediately after contact of VSOP with living cells, a rapid interaction of VSOP with cell surface structures could be derived. After intravenous application of VSOP in LDL-receptor deficient (LDLR<sup>-/-</sup>) mice an accumulation of VSOP was detectable with MRI at typical predilection sites such as the small curvature of the aortic arch and the brachiocephalic trunk as soon as 30 minutes after application. After the same period, a rapid uptake into Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) was detected via transmission electron microscopy. Prior postulated differences in VSOP-uptake among macrophage phenotypes regarding iron quantities were not confirmed. Due to the rapid intake of VSOP into plaque areas, the migration of VSOP-loaden PBMC through neovascularisations or fusion with the cell membrane as the main uptake mechanism could be excluded. As VSOP can still be detected in PBMCs 7 days after injection, uptake of VSOP into plaques by this mechanism still appears to be possible to a small extent. A passive uptake of VSOP could be eliminated after erythrocytes, as coreless cells incapable of endocytosis, did not show any intake of nanoparticles in analyses using transmission electron microscopy. By combining the observations of the experiments with already existing data the main mechanism involved in VSOP-uptake was identified as glycosaminoglycan-dependent transcytosis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Atherosklerose

### 1.1.1 Epidemiologie, Folgeerkrankungen und Risikofaktoren

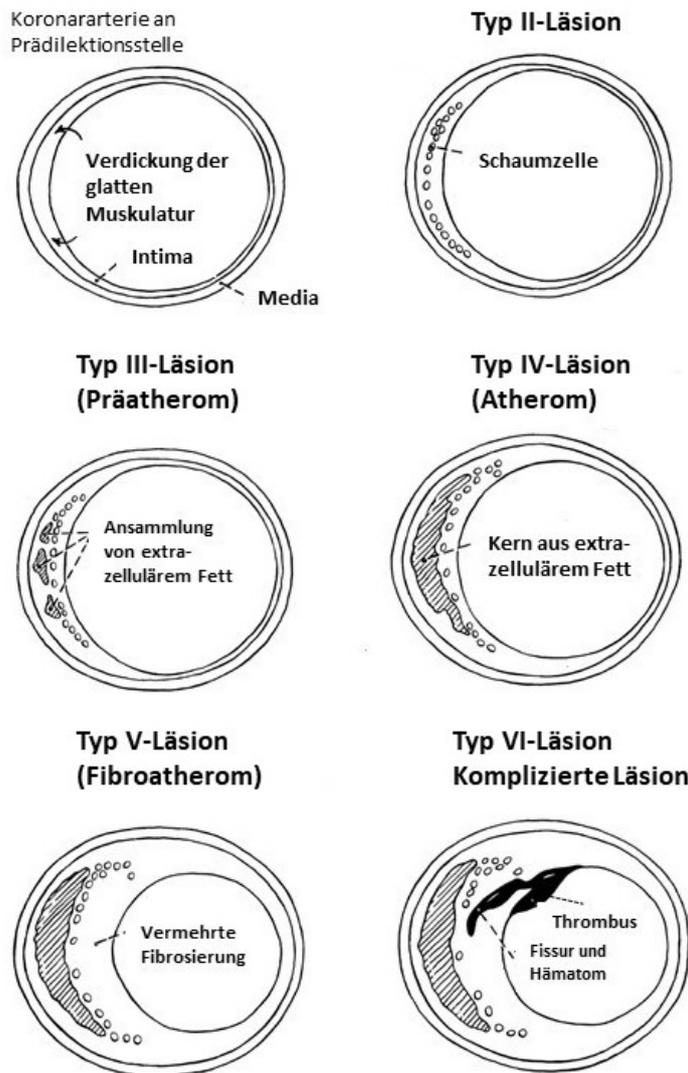
Der Begriff der Atherosklerose wurde erstmals 1833 von J. Lobstein benutzt, um eine sklerosierende Gefäßveränderung zu beschreiben. [1] Er leitet sich aus den beiden altgriechischen Worten ἀρτηρία artería (= „Ader/Gefäß“) und σκληρός sklerós (= „hart“) ab. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Atherosklerose als „unterschiedliche Kombination von Veränderungen der Intima der Arterien [...], die sich durch lokale Anreicherungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrösem Gewebe und Kalziumablagerungen kennzeichnet und mit Veränderungen der Media einhergeht“, definiert. [2] Als Folge dieser Veränderungen kommt es im Verlauf zu verschiedensten klinischen Manifestationen. Die Atherosklerose gilt als Hauptursache von kardiovaskulären Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit (KHK), zerebralem Insult, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, subkortikaler arteriosklerotischer Enzephalopathie/Vaskulärer Demenz und anderen Erkrankungen. [3] Weltweit gesehen stellten im Jahre 2014 kardiovaskuläre Erkrankungen mit 17,5 Millionen Todesfällen bzw. mit einem Anteil von 46,2% die Haupttodesursache unter den nicht ansteckenden Erkrankungen dar. [4] Auch in Deutschland führten Herz-Kreislaferkrankungen mit 345274 Todesfällen im Jahr 2018 die Todesursachenstatistik an. [5] Laut Prognosen der WHO werden auch noch 2030 durch Atherosklerose verursachte Erkrankungen weltweit die Haupttodesursache darstellen. [6] Aus gesundheitsökonomischer Sicht verursachten kardiovaskuläre Erkrankungen im Jahr 2015 mit 46,47 Milliarden Euro bzw. 13,7% der Gesamtausgaben im Bereich der Gesundheitsversorgung den größten Kostenpunkt im Vergleich zu anderen Diagnosen [7]. Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose und damit einer kardiovaskulären Erkrankung gehören Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, erhöhtes Low-Density Lipoprotein- (LDL-) und erniedrigtes High-Density Lipoprotein (HDL-) Cholesterin, Diabetes Mellitus, frühzeitige Herz-Kreislaferkrankungen in der Familienanamnese und hohes Alter. [8]

### 1.1.2 Pathogenese

Atherosklerose ist ein äußerst komplexer entzündlicher Vorgang mit multifaktorieller Genese, an dem auf molekularer Ebene eine Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt sind. Bevor sich die Atherosklerose mit der Ausbildung von Plaques manifestiert, kommt es im Allgemeinen zu einer

Funktionsstörung des Gefäßendothels. Bereits Rudolf Virchow erkannte die Gefäßveränderungen, die im Rahmen entzündlicher Vorgänge auftreten. [9] Dies ist auch Bestandteil der „Response-to-injury“-Hypothese, die von Ross et. al. 1973 formuliert wurde und ursprünglich von einer Endothelschädigung im Sinne einer lokalen Denudierung des Endothels ausging. [10, 11] Diese Hypothese korrigierte er, nachdem allgemein akzeptiert wurde, dass auch ein mikroskopisch intaktes Endothel in seiner Funktion beeinträchtigt sein kann. [12] Diese Endothelschädigung kann durch eine chronische Hyperlipidämie [13], eine vermehrte Ansammlung von Metaboliten wie Harnstoff [14] oder Homocystein [15, 16], Infektionen durch bestimmte Krankheitserreger wie z.B. Chlamydia pneumoniae [17], vermehrter Anfall freier Radikale durch Tabakkonsum, immunologische Veränderungen, mechanische Belastungen durch hämodynamische Veränderungen [18] und weitere Faktoren verursacht werden. Insbesondere einer Veränderung des laminaren Blutflusses und damit einer geringeren protektiven Wirkung durch „Shear Stress“ wurde in den letzten Jahren eine größere Aufmerksamkeit in der Entstehung atherosklerotischer Plaques zuteil. Das erklärt auch das Vorhandensein von Prädispositionsstellen für die Entwicklung von atherosklerotischen Veränderungen an großen Gefäßverzweigungen und -abgängen, an denen Verwirbelungen des Blutstroms auftreten und der laminare Fluss gestört ist. [19] Durch vermehrte subendotheliale Retention von Apolipoprotein-B-Komplexen kommt es zu einer Aktivierung des Endothels und anschließender Ausschüttung von Chemo- und Zytokinen wie des „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1), „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1), „monocyte chemotactic protein 1“ (MCP-1), „very late antigen-4“ (VLA-4), „lymphocyte function-associated antigen 1“ (LFA-1) und Monozyten-Interferon-1, die die Adhäsion und Migration von Monozyten und T-Lymphozyten in den Plaquebereich vermitteln. Das aufgenommene LDL wird teilweise durch Lipoxygenasen, Myeloperoxidasen und reaktive Sauerstoffspezies oxidiert oder anderweitig modifiziert und stellt einen eigenen inflammatorischen Stimulus dar. [20, 21] Die eingewanderten Entzündungszellen sezernieren Proteoglykane, die die Bindung von Apolipoprotein-B-Komplexen wiederum verstärken und somit die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. [22] Thrombozyten binden über Glykoprotein IIb/IIIa an das aktivierte Endothel und setzen Granulae mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren frei, die die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Monozyten stimulieren. Das Endothel verliert seine antikoagulatorischen Eigenschaften und ist in seiner Funktion als Permeabilitätsbarriere gestört. [23] Bei anhaltendem Entzündungsreiz entwickelt sich progressiv eine atherosklerotische Plaque. Eine Überexpression von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP), die durch Makrophagen sezerniert werden, bewirkt einen Abbau der Extrazellulärmatrix. Dadurch kommt es zu einer Verschmälerung der die Plaque bedeckenden

Bindegewebsschicht, einer zunehmenden Plaqueinstabilität mit Gefahr der Ruptur und Entwicklung eines Thrombus. [24] Im Endstadium enthält der Plaque einen Kern aus Lipiden und wird von einer fibrösen Kappe bedeckt, man spricht dann von einer fortgeschrittenen, komplizierten Läsion. Charakteristisch für diese vulnerablen Plaques sind ein großes Plaquevolumen, ein hoher Lipidgehalt, eine große Anzahl an Schaumzellen und Makrophagen, eine geringe Anzahl an kollagensynthetisierenden glatten Muskelzellen und eine dünne fibröse Kappe. [25] Die Prädilektionsstelle für eine Plaqueruptur liegt in der Schulterregion der Plaque, die den Übergang zwischen instabiler Plaque und gesundem Gefäßendothel darstellt. [26, 27] Durch kompensatorische Dilatation der Arterie kommt es erst ab Stenosierungen über 40 % zu einer Einengung des Gefäßlumens, was als Glagov-Effekt bezeichnet wird. [28] Stary klassifizierte 1995 erstmals atherosklerotische Plaques anhand histologischer Untersuchungen in Typ I, II, III, IV, Va-c und Typ VI. [29, 30] Diese Klassifikation wurde durch Virmani et.al um die Jahrtausendwende leicht modifiziert. [31, 32] Durch Plaqueruptur einer komplizierten, fortgeschrittenen Läsion entsteht eine freiliegende, nicht von Endothel bedeckte Fläche. Über den Tissue-factor vermittelt kommt es anschließend zu einer gesteigerten Thrombozyten- und Erythrozytenadhäsion mit nachfolgender Bildung eines roten Thrombus. [33] Löst sich dieser vom Plaquebereich und wird durch den Blutfluss mitgerissen, kann es zu einer Okklusion von gehirn- oder herzversorgenden Gefäßen und somit zu einem ischämischen Schlaganfall bzw. Herzinfarkt kommen. Das beschriebene Fortschreiten einer atherosklerotischen Plaque bis zur Entwicklung einer komplizierten Läsion ist in Abbildung 1 dargestellt.



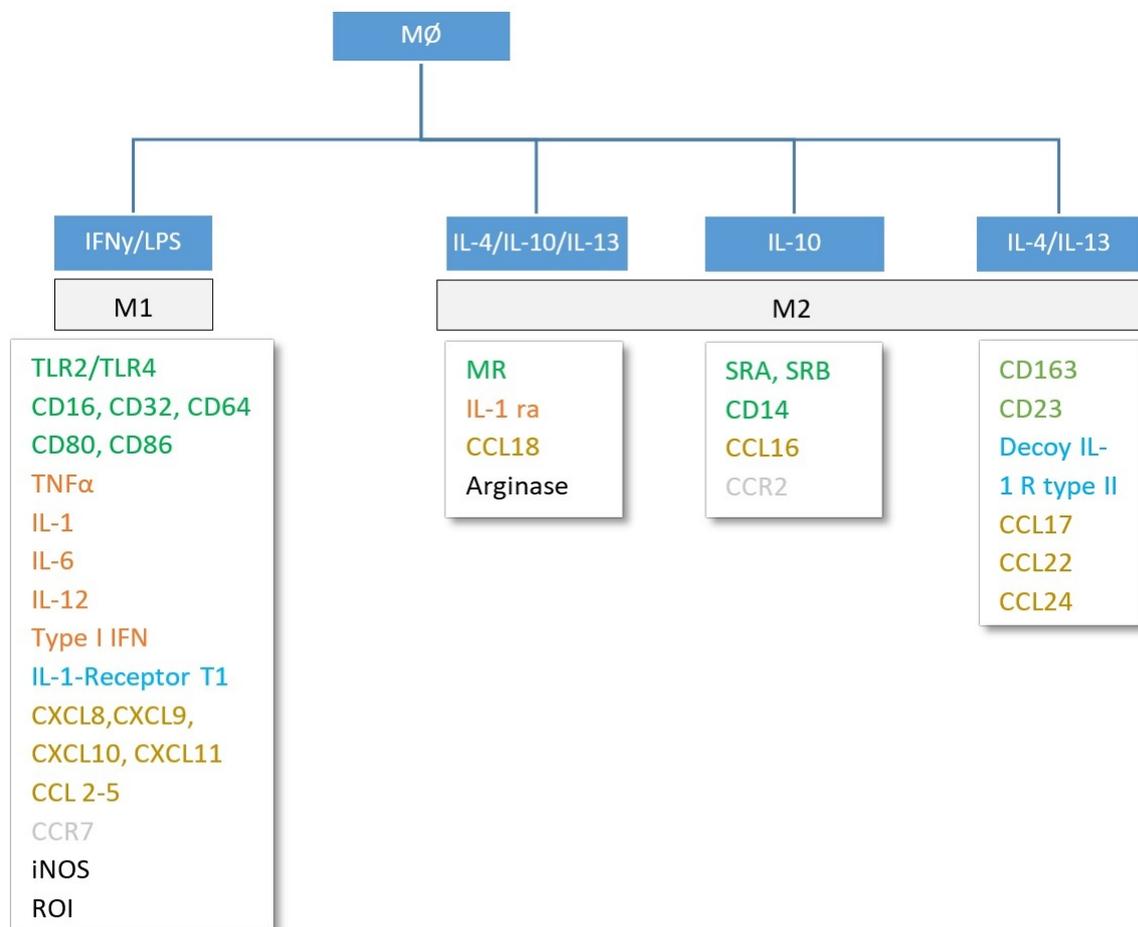
**Abbildung 1:** Progress der atherosklerotischen Läsion, übersetzt aus dem Englischen aus Stary, H.C., et al., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation, 1995. 92(5): p. 1355-74., Lizenznr.: 4657591331619

### 1.1.3 Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose

Makrophagen und Monozyten werden eine zentrale Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques zugeschrieben. Bereits in Frühformen der Atherosklerose, den „fatty streaks“, die auch bei Kindern nachgewiesen werden können, finden sich Ansammlungen von Makrophagen und T-Lymphozyten. [29] Die Anzahl zirkulierender Monozyten scheint mit dem Risiko der Entwicklung atherosklerotischer Plaques assoziiert zu sein. [34] Ein Großteil der in den Plaquebereich migrierten Monozyten entwickelt sich unter Einwirkung des Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)

zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. [35] Die Makrophagen nehmen über den Scavenger-Receptor-A (SRA) und CD36, der zu den Scavenger-Rezeptoren des B-Typs gezählt wird, oxidiertes LDL (oxLDL) auf und entwickeln sich zu Schaumzellen. Die aufgenommenen Lipoproteine werden in Endosomen zu freiem Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Das Cholesterin kann nun entweder durch die Acetyl-CoA-Cholesterolestertransferase (ACAT) erneut verestert werden oder über die „ATP-binding cassette“, Subfamilie A und G (ABCA1- und ABCG1) vermittelt, die Zelle verlassen und somit die Plaqueregression fördern. Verschiedene Signalwege lösen eine inflammatorische Antwort der Makrophagen aus. Insbesondere eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und des Makrophagen-Inflammasoms scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. [36-38] Die Emigration der Makrophagen aus dem Plaquebereich wird durch migrationsinhibierende Moleküle, die durch Schaumzellen sezerniert werden, vermindert. Nicht nur die Anzahl an Entzündungszellen charakterisiert die Stabilität einer atherosklerotischen Plaque, sondern auch deren Phänotyp. Es werden zwei große Makrophagenpopulationen - die M1- und die M2-Population - unterschieden. Der M1-Phänotyp, der sich unter Stimulierung mit Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Lipopolysacchariden (LPS) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) im Rahmen einer klassischen Aktivierung entwickelt, ist vermehrt in instabilen Plaques zu finden. [39, 40] M1-Makrophagen sezernieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 23 (IL-23) und TNF- $\alpha$ . Als Zeichen ihrer eigentlichen Funktion in der Abwehr bakterieller Infektionen sezernieren sie außerdem Stickoxide und reaktive Sauerstoffspezies. Von M1-Makrophagen sezernierte Chemokinliganden der CXC-Familie wie CXCL9, CXCL10 und CXCL5 führen zu einer weiteren Rekrutierung von Typ1-T-Helferzellen (Th-1-Zellen) und Natural-Killer-Zellen. Zur Identifikation der Makrophagenpopulationen werden die Expressionsmuster der Oberflächenmarker und Zytokine herangezogen. Marker und Zytokine, die bei klassisch-aktivierten Makrophagen verstärkt exprimiert werden, sind IL-1 $\beta$ , Interleukin 6 (IL-6), IL-12, IL-23, TNF $\alpha$ , CXCL2/MCP-1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, major histocompatibility complex II (MHCII), CD86, CD80 und „macrophage receptor with collagenous structure“ (MARCO). [41, 42] Die klassische Aktivierung wurde bereits 1962 von Mackaness et. al. beschrieben. [43] Der M2-Phänotyp hingegen, der sich unter Stimulation mit Interleukin 4, 10, 13 (IL-4, IL-10, IL-13) oder tumor growth factor beta (TGF- $\beta$ ) entwickelt und als alternative Aktivierung bezeichnet wird, hat eine

atheroprotektive Wirkung. Dieser alternative Aktivierungsweg wurde erst deutlich später in den 1990-ern identifiziert. [44, 45] M2-Makrophagen, die je nach Stimulation und Expression von Oberflächenmarkern weiter in M2a-d differenziert werden, wirken durch die Sekretion von TGF- $\beta$ , insulin-like growth factor (IGF) und Fibronectin plaquestabilisierend. Ihnen werden außerdem stärkere phagozytierende und proangiogenetische Eigenschaften sowie eine wichtige Funktion im Eisenstoffwechsel zugeschrieben. Die klassischen Zellmarker für alternativ aktivierte Makrophagen sind unter anderem Arginase-1, der Mannose-6-Rezeptor, das resistin-like molecule alpha (FIZZ1) und Transglutaminase 2 (TGM2). [42] Innerhalb der beiden Phänotypen gibt es weitere Subpopulationen, die untereinander in einem plastischen Gleichgewicht stehen, der Makrophagenphänotyp ist demnach kein definitiver Zustand. [41, 46, 47]



**Abbildung 2:** Schematischer Überblick der verschiedenen Makrophagenpopulationen und ihrer Zytokine und Oberflächenproteine, adaptiert nach Mantovani et al. [48], **grün:** Membranrezeptoren, **orange:** Zytokine, **blau:** Zytokinrezeptor, **gelb-grün:** Chemokine, **grau:** Chemokinrezeptoren, **schwarz:** Effektormoleküle

## **1.2 Bildgebung der Atherosklerose**

Zur Darstellung atherosklerotischer Veränderungen existieren verschiedene Verfahren, die teilweise bereits Einzug in den klinischen Alltag gefunden haben.

### **1.2.1 Invasive Bildgebung**

#### **1.2.1.1 Kathetergestützte Angiographie**

Bei der kathetergestützten Angiographie wird über eine arterielle Schleuse iodhaltiges Kontrastmittel selektiv in das zu untersuchende Gefäß injiziert und unter Durchleuchtung mittels C-Bogen das Gefäßlumen und der Kontrastmittelabfluss dargestellt. Da instabile, rupturgefährdete Plaques infiltrativ wachsen und durch den Glagov-Effekt nicht zwangsläufig das Arterienlumen verringern, sind diese mittels herkömmlicher Katheterangiographie häufig nicht nachzuweisen. [27] Bei Patienten mit normalem Angiographiebefund kann teilweise sonographisch eine Plaqueruptur diagnostiziert werden. [27, 49] Stenosierende Plaques hingegen können durch kathetergestützte Angiographien mit einer hohen Sensitivität dargestellt werden. Nachteile der Methode sind eine verringerte Sensitivität bei einer ausgeprägten generalisierten Atherosklerose und langstreckigen Stenosen, eine hohe Invasivität und dadurch entstehende Komplikationen, die Notwendigkeit eines iodhaltigen Kontrastmittels mit seinen Nebenwirkungen und eine Belastung mit Röntgenstrahlung. Ebenfalls können keine Aussagen zur Plaquezusammensetzung getroffen werden. Die kathetergestützte Angiographie ist ebenfalls aus obengenannten Gründen keine gut geeignete Methode, um die Plaqueprogression oder -regression im zeitlichen Verlauf zu beurteilen. [50]

#### **1.2.1.2 Thermographie**

Die als Thermographie bezeichnete bildgebende Untersuchung der Gefäße macht sich Temperaturschwankungen, die im Rahmen der Entzündungsreaktion durch Makrophageninfiltration im Plaquebereich auftreten, zunutze. Die Temperaturschwankungen werden mittels Katheter mit einem sehr feinen Temperatursensor bei Kontakt zur Gefäßwand gemessen. Ex-vivo- und in-vivo-Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen Temperaturheterogenität und durch Atherosklerose veränderte Gefäßabschnitte existiert. [51-53] Andere Untersuchungen zeigten keine zuverlässige Identifikation von gefährdeten atherosklerotischen Plaques. Dies ist möglicherweise in Kühlartefakten durch den Blutfluss begründet, was wiederum eine proximale Okklusion des Gefäßes bei der Untersuchung

notwendig machen würde und somit das Risiko-Nutzen-Profil bei bereits hoher Invasivität des Verfahrens weiter verschlechtern würde. [54] Zusätzlich ist auch bei diesem Verfahren keine gute Aussage über die Plaquezusammensetzung möglich.

### **1.2.1.3 Intravaskulärer Ultraschall (IVUS)**

Mittels einer an der Katheterspitze angebrachten Ultraschallsonde werden Hochfrequenzultraschallwellen ausgesendet und aus der Reflexion der Wellen, analog zur konventionellen Endosonographie, ein zweidimensionales Bild in Echtzeit rekonstruiert. Klinische Anwendungen bestehen in der Risikostratifizierung von atherosklerotischen Plaques, als Referenzbefund in klinischen Studien, zur weiteren Diagnostik bei negativer Koronarangiographie und hohem Verdacht auf Gefäßveränderungen, zur weiteren Charakterisierung von Stenosen sowie zur Untersuchung von angiographisch schwer interpretierbaren Regionen wie z.B. des linken Hauptstammgefäßes. [55] Limitierungen der Methode sind die schwierige Identifikation von Thromben und anspruchsvolle Charakterisierung des Plaqueaufbaus bei teilweise sehr ähnlicher Echogenität der Plaquekomponenten und die große Invasivität der Methode.

### **1.2.1.4 Optische Kohärenztomographie**

Die optische Kohärenztomographie funktioniert vom Prinzip her ähnlich des IVUS mit dem Unterschied, dass zur Bildgebung keine Ultraschallwellen benutzt werden, sondern die Reflexion von Infrarotlicht zur Berechnung eines Bildes herangezogen wird. Diese Methode resultiert in einer deutlich höheren Auflösung mit der Möglichkeit, die Bilder histopathologisch zu korrelieren. [56] Die Limitierungen ähneln denen des IVUS. Zusätzlich ist die Eindringtiefe mit 1-2mm sehr gering, sodass eine Darstellung größerer Plaques schwierig und die Beurteilung zusätzlich durch Blutflussartefakte erschwert ist. [57]

## **1.2.2 Nicht-Invasive Bildgebung**

### **1.2.2.1 Ultrafast Computed Tomography (UFCT)**

Die Computertomographie gehört im klinischen Alltag zu einer der wichtigsten bildgebenden Verfahren in der Tumor- oder Notfalldiagnostik. Auch im Gebiet der kardialen Diagnostik findet sie Anwendung. Die Verwendung von UFCT erlaubt eine genaue Darstellung von Kalzifizierungen der Herzgefäße und der Aorta, da Bewegungsartefakte durch Atmung und Herzaktion minimiert werden können. Auch eine Charakterisierung von Plaques der

Koronargefäße ist mittels Computertomographie möglich. [58] Das Ausmaß der Kalzifizierung der Herzgefäße ist ein Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK. [59] Mit der Computertomographie geht eine Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen einher. Die Strahlenbelastung variiert je nach Technik und untersuchtem Organ und liegt ca. zwischen 1 – 10 Millisievert. In Bezug auf die UFCT beträgt die Strahlenbelastung ungefähr 3 Millisievert. Das Risiko, aufgrund einer Computertomographie einen letalen Tumor zu entwickeln, liegt nach Risikoabschätzungen der US Food and Drug Association bei ca. 1:2000, während das Lebenszeitrisiko in den USA an einem Tumorleiden zu erkranken im Bevölkerungsdurchschnitt bei 1:5 liegt. [60] Die durchschnittliche jährliche Belastung an ionisierenden Strahlen in Deutschland durch tägliche Umwelteinflüsse beträgt circa 2,1 Millisievert, eine Untersuchung mittels UFCT geht demnach mit einer natürlichen Belastung an ionisierenden Strahlen von ca. 1,5 Lebensjahren einher. [61]

### 1.2.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Bereits heute hat die Kardio-MRT Einzug in die klinische Praxis gefunden und wird zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen eingesetzt. Durch ihre Fähigkeit Weichteilgewebe des Herzmuskels sehr gut zu differenzieren, kann beispielsweise Narbengewebe nach abgelaufenen Infarkten gut dargestellt werden. Auch hämodynamische Parameter wie linksventrikuläre Auswurffraktion, Schlagvolumen oder Klappenöffnungsfläche können mittels MRT bestimmt werden. Auch ermöglicht sie Aussagen über die Plaquekomposition durch Nutzung verschiedener Sequenzen ohne Invasivität oder Strahlenbelastung. In tierexperimentellen Studien am Kaninchenmodell konnten das arterielle Remodelling und die Plaquezusammensetzung mit den Ergebnissen von histopathologischen Untersuchungen korreliert werden. [62] Auch in in-vivo Untersuchungen von Querschnitten der menschlichen A. carotis konnten Kalzifizierungen, fibröses Gewebe, Lipidkern und Thromben mit hoher Sensitivität und Spezifität histopathologischen Untersuchungen zugeordnet werden. [63] In-vivo-MRT-Untersuchungen der menschlichen Aorta ermöglichten in Studien die Identifikation verschiedener Plaquebereiche und eine Plaquecharakterisierung nach der Klassifikation der American Heart Association (AHA). [30, 64] Gadolinium zeigte als weit verbreitetes Kontrastmittel in Untersuchungen an menschlichen Karotiden keine statistisch signifikant veränderte Anreicherung in atherosklerotischen Plaques von symptomatischen und asymptomatischen Patienten [65]. Über die Berechnung einer Transferkonstante „ $K^{trans}$ “ konnte jedoch eine Korrelation der Gadoliniumanreicherung mit Plaqueneovaskularisierung, Lockerung

der Zellmatrix sowie Makrophagendichte festgestellt werden. [66] Große Herausforderungen in der Bildgebung koronarer Plaques mittels MRT sind die deutlich geringeren Durchmesser der Koronargefäße und dadurch verhältnismäßig stärkeren Bewegungsartefakte durch Blutstrom, Herzaktion und Atmung, auch wenn es hier bereits Verbesserungsansätze durch Modifikation der MR-Sequenzen und Post-Processing Methoden gibt. [67]

### **1.3 Eisenoxidnanopartikel in der MR-Bildgebung der Atherosklerose**

Eine Risikoeinschätzung der Rupturgefahr atherosklerotischer Plaques ist mit aktuell in der Klinik angewandten bildgebenden Methoden und Kontrastmitteln nicht suffizient möglich. Oft ist das Risiko-Nutzen-Verhältnis aufgrund der Invasivität der Untersuchung unverhältnismäßig oder die Untersuchung geht mit einer Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen einher. [68] Eine nichtinvasive Technik ohne Strahlenbelastung, die bereits ihre Anwendbarkeit in Untersuchungen zur Plaquezusammensetzung gezeigt hat, ist die Magnetresonanztomographie. Um in Zukunft noch höher auflösende, zeiteffizientere MRT-Untersuchungen mit Aussagen zur Plaquezusammensetzung treffen zu können, sind neue Ansätze wie weiterentwickelte MR-Sequenzen oder Post-Processing-Protokolle notwendig. Insbesondere Kontrastmittel mit einer bevorzugten Anreicherung in rupturgefährdeten Plaquebereichen ermöglichen die individuelle Anfertigung eines Risikoprofils für atherosklerotische Plaques. So ließe sich die Notwendigkeit einer prophylaktischen Intervention, wie z.B. einer direktionellen Atherektomie oder der Einleitung einer medikamentösen Therapie feststellen und im Sinne einer Primärprävention eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts durchführen. Während Gadolinium-basierte Kontrastmittel in der klinischen MRT-Diagnostik bewährte und vielfach eingesetzte Kontrastmittel darstellen, sind in den letzten Jahren neben den bekannten Nebenwirkungen wie die nephrogene systemische Fibrose (NSF) und allergischen Reaktionen zunehmende Bedenken über potentielle Langzeitfolgen aufgekommen. Nach einer Studie aus dem Jahre 2014 von Kanda et. al., in der eine Korrelation zwischen signalintensiven Bereichen im Nucleus caudatus und Globus pallidus mit erfolgten MRT-Untersuchungen mit Gadolinium als Kontrastmittel hergestellt wurde, konnten diese Ablagerungen in nachfolgenden Untersuchungen tatsächlich als Gadoliniumablagerungen identifiziert werden. [69] Selbst bei den als strukturell stabil geltenden makrozyklischen Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln und nach nur einmaliger Applikation konnten Ablagerungen detektiert werden. [70] Im Tiermodell wurden außerdem zusätzliche Ablagerungen von Gadolinium in Knochen und Haut beschrieben. [71] Auch wenn aktuell weder im Tiermodell noch beim Menschen durch Ablagerungen bedingte Kurz- oder

Langzeitnebenwirkungen durch Gadoliniumapplikation bekannt sind, empfehlen sowohl die „International Society of Magnetic Resonance (ISMRM)“ als auch die „US Food and Drug Administration (FDA)“ eine Risikoabwägung, insbesondere für repetitive Kontrastmittelapplikationen. Daher wäre die Erforschung und Entwicklung eines neuen Kontrastmittellagens, welches nebenwirkungsfrei oder –arm ist und in der Praxis für eine Vielzahl an Fragestellungen eingesetzt werden kann, wünschenswert. Mögliche Agentien in der Nutzung als Kontrastmittel sind superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO). SPIO werden anhand ihrer Partikelgröße und –beschichtung weiter klassifiziert. Während SPIO einen durchschnittlichen Partikeldurchmesser von ca. 150 nm besitzen, sind die ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) mit einem Durchmesser von 20 – 40 nm deutlich kleiner. Bei beiden Partikelarten handelt es sich um polymerbeschichtete, sterisch stabilisierte Nanopartikel. Eine weitere Klasse von Eisenoxid-Nanopartikeln sind VSOP. VSOP sind Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von 4-5 nm, einem Partikeldurchmesser von 7 nm und einem hydrodynamischen Durchmesser von  $8.1 \pm 4$  nm. Sie besitzen einen Kern aus Eisenoxid, der von einer Citratbeschichtung umgeben ist. Im Gegensatz zu USPIO und SPIO sind VSOP demnach deutlich kleiner, besitzen eine Monomerbeschichtung und sind durch Wechselwirkungen von Hydroxy- und Carboxygruppen der Zitronensäure mit den Eisenionen im Partikelkern elektrostatisch stabilisiert. [72] Sowohl USPIO, SPIO als auch VSOP sind superparamagnetische Moleküle. Sie gehen im Gegensatz zu ferromagnetischen Molekülen untereinander keine Wechselwirkungen ein und erhalten erst in Anwesenheit eines Magnetfelds magnetische Eigenschaften. Eisenoxid-Nanopartikel stellen sich in T2-gewichteten MRT-Sequenzen durch ihre Eigenschaft, die Resonanzfrequenz umgebender Wasserstoffionen zu verändern und damit deren Relaxationszeit zu verkürzen, als negativer Kontrast, also als Signalauslöschung, dar. Mit Hilfe bestimmter Sequenzen bzw. Post-Processing-Methoden wie dem „susceptibility gradient mapping“ kann das Signal in einen positiven Kontrast umgewandelt und die Diskriminierung des Signals weiter verbessert werden. In verschiedenen Studien konnte die Eignung von Nanopartikeln mit Eisenkern als Kontrastmittel in der MRT-Bildgebung gezeigt werden, sodass diese bereits Einzug in die klinische Diagnostik, z.B. im präoperativen Staging von Lebermetastasen, gefunden haben. [73] USPIO zeigten zudem eine Anreicherung in atheromatösen und rupturgefährdeten Plaques humaner Arteriae carotides. [74, 75] Der klinisch bedeutsame Unterschied in der Verwendung von USPIO, SPIO und VSOP in der Bildgebung liegt in der Geschwindigkeit der zellulären Anreicherung. Nach intravenöser Applikation von SPIO und USPIO muss für ein optimales Ergebnis ein Zeitraum von mindestens 24 Stunden, teilweise sogar von mehreren Tagen verstreichen. [74-76] Für den klinischen Alltag bedeutet

dies, dass MRT-Untersuchungen mit ferromagnetischen Nanopartikeln nur elektiv und mit einem Vorlauf von mindestens 24 Stunden geplant werden könnten, ambulante Patienten müssten für die Untersuchung erneut einbestellt werden. Daher wäre ein Kontrastmittel von Vorteil, das sich sehr schnell in atherosklerotischen Plaques anreichert und somit eine Untersuchung in gleicher Sitzung ermöglicht. In in-vitro und in vivo-Untersuchungen am Rattenmodell zur Pharmakodynamik von Eisenoxidnanopartikeln konnte der Einfluss der Partikelgröße und – beschichtung auf Bluthalbwertszeit und Aufnahme in phagozytierende Zellen gezeigt werden. Mit steigendem Partikeldurchmesser kommt es zu einer Verstärkung der relaxivity  $r_2$  und einer Verkürzung der Bluthalbwertszeit. In-vitro zeigten Partikel mit größerem hydrodynamischem Durchmesser eine stärkere Anreicherung in Makrophagen.[77] VSOP, die aufgrund ihres geringen hydrodynamischen Durchmessers eine vergleichbar lange Bluthalbwertszeit von ca. 20 – 30 Minuten besitzen [78], reichern sich in monozytären Zellen jedoch zügiger an als SPIO. [79] Eine an 18 gesunden Probanden durchgeführte Phase I Studie konnte bei nur milden Arzneimittelnebenwirkungen eine gute Verträglichkeit von VSOP nach intravenöser Injektion zeigen. [80] Eine Phase II Studie bewies zudem die Eignung von VSOP als Kontrastmittel in der koronaren MR-Angiographie und bestätigte erneut das günstige Nebenwirkungsprofil. [81] Der Zeitpunkt der optimalen Plaquedarstellung nach VSOP-Injektion wird durch die intravaskuläre Konzentration eingeschränkt, sodass für eine gute Abgrenzbarkeit der Plaques zum Gefäßlumen zwei Bluthalbwertszeiten vergehen sollten. VSOP-Partikel haben folglich einen großen Vorteil bezogen auf die routinemäßige klinische Anwendbarkeit. Für eine Vielzahl klinischer Fragestellungen konnte eine mögliche Anwendung von VSOP bereits demonstriert werden. Insbesondere zur Darstellung inflammatorischer Prozesse wie Abszesse, Abstoßungsreaktionen, Gewebereaktionen nach Herzinfarkt, Pankreatitis und Multipler Sklerose sind die Partikel prinzipiell geeignet. [74-76, 82-86]

### 1.3.1 VSOP-Cell-Labeling

Das Cell-Labeling, also die Markierung von lebenden Zellen, ist eine Methode, die mit der Entwicklung neuartiger Zelltherapien, z.B. in der Neurologie oder Onkologie, in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat. Sie ermöglicht das Monitoring von Zellen im Körper eines Lebewesens. So können Aussagen zu optimalem Administrationsweg und notwendiger Dosierung sowie Verteilung der Zellen in verschiedenen Organkompartimenten getroffen werden. Dies ist auch notwendig, um Zulassungskriterien für neue Zelltherapeutika zu erfüllen. Eine Methode des Cell-Labelings ist die Markierung der injizierten Zellen mit SPIO und

anschließender MRT-Bildgebung. [87] Die Bildgebung über Kopplung der Zellen mit Radionukleotiden ist eine weitere Möglichkeit des in-vivo Zellmonitoring, jedoch verbunden mit hohen Kosten, Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen und damit Bedenken zur Patientensicherheit. [88] Im Gegensatz zu mit Mangan oder Gadolinium inkubierten Zellen ist die Zellauflösung durch den negativen Kontrast bei SPIO höher. Durch Verwendung besonderer, aufwändiger Sequenzen ist selbst eine Darstellung einzelner Zellen möglich. [89] Die klassische MRT-Bildgebung nach SPIO-Applikation liefert lediglich eine grobe Information über die Lokalität der Zellen bei geringer örtlicher Auflösung ohne exakte Quantifizierung des Nanopartikelgehalts. Eine Eisenquantifizierung ist erst post-mortem durch eine histologische Aufarbeitung möglich. Genaue Aussagen über Veränderungen der magnetischen Eigenschaften im Rahmen der Aufnahme und Metabolisierung im Körper können nicht getroffen werden. Zur Anreicherung von SPIO bedarf es außerdem eines Inkubationszeitraums von ca. 24 Stunden. Da VSOP eine schnellere und wirksamere Zellanreicherung gezeigt haben, wäre ihre Verwendung als Partikel zur Zellmarkierung gut vorstellbar. Die Aufnahme von VSOP durch T-Zellen, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen, Stammzellen, neuronale Vorgängerzellen sowie Humane Endothelzellen der Nabelvene (HUVEC) konnte bereits demonstriert werden, sodass sich hieraus ein breites Spektrum in der Anwendung ergeben würde. Die Zellverträglichkeit von VSOP konnte außerdem in verschiedenen klinischen Studien bestätigt werden [78, 79]. Die mittels VSOP angereicherten Zellen müssen jedoch vor Injektion zur verbesserten Patientensicherheit genauestens charakterisiert werden. Bisherige Methoden zur exakten Eisenquantifizierung wie kalorimetrische und photometrische Methoden gehen mit einem Verlust der Zellvitalität einher und sind somit in diesem klinischen Kontext unbrauchbar, sodass es einer Untersuchungsmodalität bedarf, die eine genaue Zellcharakterisierung bei gleichzeitig erhaltener Zellvitalität ermöglicht. Eine solche mögliche Methode ist die Magnetpartikelspektroskopie (MPS). Die MPS detektiert die nichtlineare Antwort magnetischer Nanopartikel in einem oszillierenden Magnetfeld. Während der Messung mittels MPS werden weitere Messdaten erfasst, die als „harmonic ratios“ bezeichnet werden. Die „harmonic ratios“ bilden das MPS-Spektrum der magnetischen Nanopartikel (MNP) und sind ungerade Vielfachen der „drive frequency ( $f_{excit}$ )“ und werden folglich mit  $A_{1,3,5,7}$  etc. nummeriert. Sie entstehen aus der Fourier-Transformation der messbaren Veränderung im Magnetfeld. Das Signal der harmonic ratios verliert fortlaufend an Intensität, sodass zur Quantifizierung des magnetischen Eisens die stärkste harmonic ratio  $A_3$  genutzt wird. Die verschiedenen harmonic ratios werden standardmäßig bei jeder Messung erfasst, sodass kein erweitertes Messprotokoll notwendig ist. Veränderungen im Verhältnis harmonischer Schwingungen sind bereits durch Änderungen der

Brown'schen Molekularbewegung im Rahmen von Temperaturschwankungen, veränderter Mediumviskosität und Molekülbindung beschrieben worden. [90] Es ist zudem bekannt, dass Nanopartikel nach Kontakt mit Serum eine Protein-Korona ausbilden, die eine Vielzahl von Proteinen, Lipiden und Kohlenwasserstoffen enthält. Die Zusammensetzung dieser Korona ist sehr stark abhängig von den Partikelcharakteristika. [91] Die magnetischen Eigenschaften von Nanopartikeln unterscheiden sich nach deren Größe, der Oberflächenbeschichtung und -ladung, Zellstruktur und Größe des Eisenkerns, sodass durch Veränderung einer dieser Parameter während der Partikelaufnahme Veränderungen in den magnetischen Eigenschaften zu erwarten sind. Wie bereits bekannt, hängt die Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Zellen von sehr vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Dazu gehören unter anderem Größe, Form, Oberflächenladung, funktionelle Gruppen und Liganden, Hydrophobizität/Hydrophilizität der Partikel genauso wie Wassergehalt, pH-Wert, Protein-, Fett- und Salzgehalt des Suspensionsmediums. [92]

#### **1.4 Fragestellung der Arbeit**

Verschiedene Zellpopulationen (THP-1-Monozyten, THP-1-Makrophagen, HUVEC, T-Zellen, Endothelzellen etc.) nehmen VSOP auf, der zelluläre Aufnahmemechanismus ebenso wie der Transport zu atherosklerotischen Plaques bleibt jedoch weitestgehend unbekannt. Verschiedene mögliche Aufnahmemechanismen von Eisenoxidnanopartikeln wurden postuliert:

1. Bindung/Aufnahme in extrazelluläre Vesikel (Matrixvesikel, Ektosomen) mit anschließender Migration in atherosklerotische Plaques [93]
2. Aufnahme in zirkulierende monozytäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit anschließender Migration in atherosklerotische Plaques [94]
3. Passive Diffusion der VSOP durch die Zellmembran, ggf. verstärkt durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität oder passive Diffusion durch pathologisch durchlässigere tight junctions [74]
4. Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport mit Migration der VSOP in Plaques durch Vasa Vasorum [74]

5. Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport mit anschließender Aufnahme über aktive Aufnahmeprozesse wie Endozytose [79]

Frühere Forschungsergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Glykosaminoglykan-vermittelten Endozytose in der VSOP-Aufnahme hin. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Glykosaminoglykansynthese durch Glukoseentzug eine verminderte Bindung der Nanopartikel zur Folge hat. Auch andere Strukturen wie „apoptotic bodies“ scheinen eine hohe Affinität zu VSOP zu besitzen. [79] Bereits beschriebene Voruntersuchungen mit USPIO-Partikeln lassen ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten durch M1- und M2-Makrophagen vermuten. [95] Sollten sich die Ergebnisse auf VSOP übertragen lassen, hätte dies positive Auswirkungen auf die Rolle von VSOP als Kontrastmittel in der Bildgebung atherosklerotischer Plaques. Eine stärkere Anreicherung in instabilen Plaquebereichen mit einem höheren Anteil an M1-Makrophagen könnte eine bessere Einschätzung des Risikos eines bevorstehenden Herzinfarkts und die weitere Unterteilung von Patienten in verschiedene Risikogruppen bei quantitativ ähnlicher Atheroskleroseausprägung ermöglichen. Daraus formulieren sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen der Laborversuche beantwortet werden sollten:

1. Lässt sich die Aufnahme von VSOP in Zellpopulationen mit Hilfe der MPS unter Erhalt der Zellvitalität nachverfolgen? Sind über Analyse des MPS-Signals Rückschlüsse auf den Aufnahmemechanismus bzw. die weitere Prozessierung der Nanopartikel möglich?
2. Welche Rolle spielen monozytäre Zellen und Makrophagen bei VSOP-Aufnahme und -Transport zu atherosklerotischen Plaques? Gibt es einen Unterschied in der Aufnahme von VSOP innerhalb verschiedener Makrophagensubpopulationen?
3. Ist eine Anreicherung von VSOP in atherosklerotischen Plaques am Mausmodell festzustellen? Falls ja, nach welchem Zeitraum ist MRT-morphologisch eine Signalauslöschung erkennbar? Welche Rückschlüsse auf einen möglichen Aufnahmemechanismus sind hierdurch möglich?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

| GERÄTE                                    | HERSTELLER              |
|-------------------------------------------|-------------------------|
| Inkubationsschrank Function Line          | Heraeus Instruments     |
| Lichtmikroskop <i>Dmil</i>                | Leica                   |
| Wasserbad <i>Sw-20c</i>                   | Julabo                  |
| Zentrifuge <i>Megafuge 3.0r</i>           | Thermo Scientific       |
| Kühlzentrifugen 5415r, 5427r              | Eppendorf               |
| Sicherheitswerkbank <i>Tecnoflow</i>      | Integra Biosciences     |
| Zentrifuge 5415c                          | Eppendorf               |
| Tischzentrifuge <i>Galaxy Mini</i>        | VWR International       |
| Zentrifuge Labofuge 400r                  | Heraeus Instruments     |
| Zentrifuge Biofuge Pico                   | Heraeus Instruments     |
| Zentrifuge Universal 32r                  | Hettich Zentrifugen     |
| Vortexer Vortex Genie 2                   | Scientific Industries   |
| Vortexer Reax 2000                        | Heidolph                |
| Vortexer Ms1 Minishaker                   | IKA                     |
| Durchflusszytometer CyanADP               | DakoCytomation          |
| Heizblock                                 | Biometra                |
| Heizofen Hb-1000 Hybridizer               | UVP Laboratory Products |
| Autoklav V-150                            | Systemc                 |
| Flockeneisbereiter Af 200                 | Scotsman                |
| Absorbance Microplate Reader Spectra Max  | Molecular Devices       |
| Spectrophotometer Nanodrop 2000           | Thermo Scientific       |
| Rtq-Pcr Cycler 7300 Real Time Pcr-Systems | Applied Biosystems      |
| Pcr Cycler Mastercycler Gradient          | Eppendorf               |
| Präparierbesteck                          | Braun                   |
| Zellzählkammer                            | Neubauer                |

|                                           |                   |
|-------------------------------------------|-------------------|
| Laborpipette research 1-1000µl            | Eppendorf         |
| Multilaborpipette research pro 1000µl     | Eppendorf         |
| Laborpipette eppendorf reference 1-1000µl | Eppendorf         |
| Laborpipette 4500 1000µl                  | Labsystems        |
| Laborpipette pipetman 10-1000µl           | Abimed Langenfeld |
| Transmissionselektronenmikroskop          | Leo Zeiss         |
| Ultramicrotom                             | Leica             |
| Diamantmesser                             | Diatome           |
| Durchflusszytometer                       | ROTH              |
| Magnetpartikelspektrometer                | Bruker Biospin    |

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| VERBRAUCHSMATERIALEN                          | HERSTELLER                            |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------|
| Agarose 1%                                    | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA |
| Bakterienschalen 10cm                         | Greiner Bio-One                       |
| Zellkulturschalen 10cm                        | BD Falcon, Germany                    |
| Mikroreaktionsgefäße                          | eppendorf                             |
| Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)         | Sarstedt                              |
| Spritzenkanüle Microlance 3 (23g; Sterile)    | BD Biosciences                        |
| Spritze 5ml/20ml                              | BRAUN                                 |
| Sterile Einmalpipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml) | BD Falcon, Germany                    |
| Sterile Vacuumfilter 500ml                    | Nalge Nunc International              |
| Kupfergrids                                   | Plano                                 |
| Zellfilter (40µm)                             | BD Biosciences/Falcon                 |
| Zellkulturflaschen (T75)                      | BD Falcon, Germany                    |
| Zellkulturflaschen (T25)                      | BD Falcon, Germany                    |
| Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Well)          | BD Falcon, Germany                    |
| Zentrifugenröhrchen (50ml; 15ml)              | BD Biosciences                        |

|              |          |
|--------------|----------|
| Zellschaber  | Sarstedt |
| Nickel-Grids | Plano    |

## 2.3 Verbrauchsreagenzien

**Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsreagenzien**

| <b>VERBRAUCHSREAGENZIEN</b>           | <b>HERSTELLER</b>           |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Ethanol                               | J.T. Baker/ROTH             |
| B-Mercaptoethanol                     | Sigma Aldrich               |
| PBS (Ohne Mg, Ca; Steril)             | PAA Laboratories            |
| PBS Dulbecco (Ohne Mg, Ca; Steril)    | Biochrome AG                |
| PBS 10x konzentriert                  | GIBCO                       |
| Isofluran <i>Forene</i>               | Abbott AG                   |
| Hydroxylamin-Hydrochlorid             | Fluka Analytical #55460     |
| O-Phenanthrolinhydrochloridmonohydrat | Fluka Analytical #31043     |
| Natriumacetat-Trihydrat               | Fluka Analytical #71190     |
| EDTA 0,5M                             | Gibco                       |
| Salzsäure >98%                        | Merck                       |
| Isopropanol 100%                      | J.T. Baker                  |
| Chloroform                            | J.T. Baker                  |
| Trizol®                               | Ambion by Life Technologies |
| Aqua Dest.                            | Hauseigene Versorgung       |
| Glutaraldehyd                         | Fluka                       |
| Osmiumtetroxid 4%                     | Roth #8088.1                |
| Araldit                               | Sigma Aldrich 3181          |
| DDSA– Bernsteinsäure                  | Sigma Aldrich 43346         |
| Propylenoxid                          | Sigma Aldrich 82320         |
| DMP 30                                | Sigma Aldrich 45348         |

## 2.4 Zellmedien

Tabelle 4: Verwendete Zellmedien

| MEDIEN           | ZUSÄTZE                        | HERSTELLER              |
|------------------|--------------------------------|-------------------------|
| RPMI MEDIUM 1640 |                                | Gibco Life Technologies |
|                  | Fetales Kälberserum            | Biochrom AG             |
|                  | Penicillin/Streptomycin        | Biochrom AG             |
|                  | MgSO <sub>4</sub> 1.00M Lösung | Sigma                   |
|                  | MEM NEAA 10x AS                | Gibco Life Technologies |

## 2.5 Zellkultur

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

| ZELLINIE        | HERSTELLER |
|-----------------|------------|
| THP-1-Monozyten | ATCC       |

## 2.6 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

| KITS                      | REAGENZIEN                | HERSTELLER |
|---------------------------|---------------------------|------------|
| Roti®-Quick-Kit           |                           | ROTH       |
| Reverse Transkriptase Kit | DNase (2U/μl)             | Invitrogen |
|                           | Hexamere (0,5μg/μl)       |            |
|                           | 5x-PCR Puffer             |            |
|                           | DTT (0,1M)                |            |
|                           | RNAse Inhibitor (40 U/μl) |            |
|                           | dNTP (10mM)               |            |
|                           | MMLV (200U/μl)            |            |
| Lympholyte-M®             |                           | Cedarlane  |

## 2.7 Zytokine

Tabelle 7: Verwendete Zytokine

| ZYTOKINE      | HERSTELLER         |
|---------------|--------------------|
| IFN- $\gamma$ | Biomol             |
| IL-4          | PromoKine          |
| M-CSF (L929)  | eigene Herstellung |

## 2.8 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

| ZIELANTIGEN | FARBSTOFF | HERSTELLER |
|-------------|-----------|------------|
| CD 45       | APC       | BioLegend  |
| CD 11B      | V450      | BD Horizon |
| F4/80       | PE        | Abcam      |

## 2.9 VSOP

Die Partikel für die in-vitro Versuche wurden von der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte gemäß der bereits beschriebenen Methodik und der Patentanmeldung von Dr. Herbert Pilgrimm. [96] Die Herstellung der Partikelcharge für die in-vivo Versuche erfolgte gemäß des in Poller et. al beschriebenen Protokolls [97] Die finale Eisenkonzentration der synthetisierten Partikel betrug 0.116 M, die Zitronensäurekonzentration 0.937 g·L<sup>-1</sup>. Der hydrodynamische Durchmesser betrug 8.7–11.0 nm. Die r1-Relaxivität betrug 25 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, die r2-Relaxivität 63.8 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>. Die Kristallisationsgröße lag bei 6.8 ± 2 nm.

## 2.10 Versuche mit Monozyten und Makrophagen

### 2.10.1 Kultivierung von BMDM aus murinem Knochenmark von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen

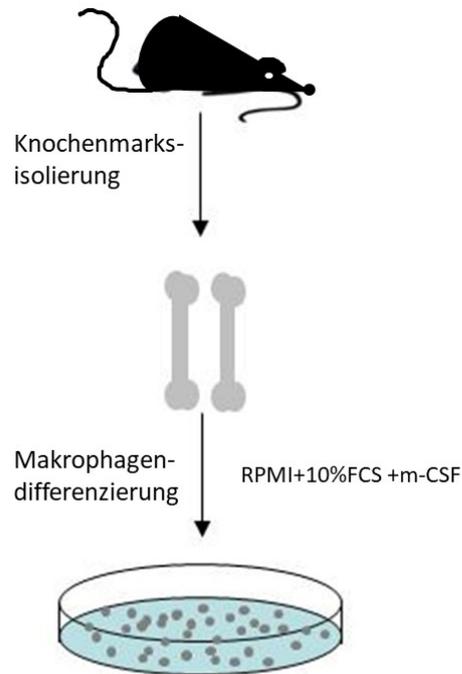
Mäuse des B6.129s7-Ldlrtm1tler/j-Stammes wurden nach Inhalationsanästhesie mit Isofluran durch Genickbruch für die Präparation von Femur und Tibia geopfert. Anschließend erfolgte nach Desinfektion mit 96%-igem Ethanol die Freilegung der Knochen mit Präparierbesteck und die Entfernung von Sehnen und Muskelresten. Die freipräparierten Knochen wurden in PBS auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Knochen mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und wieder in PBS gelagert.

In der Zellkulturbank wurden die Knochenenden mit einer Metallschere an der Epiphyse abgetrennt und mit jeweils 5 ml Roswell Park Memorial Institut-Zellmedium (RPMI-Medium) durchgespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde in einem 50 ml Falcongefäß in Medium gelagert. Anschließend wurde dieses bei 1200 rpm 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 5-10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nun wurde die Zellsuspension durch einen 40 µm Zellfilter pipettiert und mit 5-10 ml Medium nachgespült. Die erhaltene Suspension wurde erneut abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und wieder in 5 ml Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Zum Abschluss wurden die Zellen in 5 ml Zellmedium resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt mit einer Richtzellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen in 8-10 ml Vollmedium (10 % FCS; 10 % M-CSF Medium; 1 % P/S) auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

**Tag 4:** Pro Zellkulturschale wurden jeweils 10 ml frisches Medium dazugegeben. Von einer Absaugung wurde abgesehen, um keine noch nicht angehefteten Zellen zu verlieren.

**Tag 6:** Um die Zellen für die Versuche wieder gleichmäßig auszusäen, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie mit 1 ml 0,5 M EDTA-PBS-Lösung 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde abpipettiert und in Falconröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend in 5 ml Vollmedium resuspendiert. Dann wurden 20 µl entnommen, um in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen. Schließlich wurden

die Zellen gleichmäßig für weitere Versuche auf 6 cm-Zellkulturschalen mit je 3 ml Vollmedium mit einer Mindestzellzahl von  $5 \times 10^5$  ausgesät.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Makrophagenisolierung aus murinem Knochenmark. Die aus dem Knochenmark aus Femur und Tibia gewonnen Stammzellen werden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - Zellmedium mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) und Makrophagenkolonie-stiumlierendem Faktor (M-CSF) in 6 Tagen zu primären Makrophagenkolonien differenziert.

### 2.10.2 Makrophagenpolarisation

Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden an Tag 6 abgelöst (s.o.) und mit einer Zellzahl von mindestens je  $6 \times 10^5$  Zellen pro Zellkulturschale mit 3 ml Vollmedium + M-CSF ausplattiert. An Tag 7 wurden die Makrophagen dann mit den jeweiligen Zytokinen behandelt.

Für Präparationen ab  $N > 10$  wurden die ausdifferenzierten Makrophagen mit PBS gewaschen, aber in den 10 cm-Zellkulturschalen belassen.

Um eine Polarisation der naiven Makrophagen zu M1-Makrophagen auszulösen, wurden diese mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt. Für eine Polarisation zu M2-Makrophagen wurden 5 U/ml IL-4 verwendet. Dafür wurde ein Mediumwechsel mit entsprechendem Zytokingehalt, aber ohne M-

CSF durchgeführt, bei M0-Makrophagen wurde ebenfalls das Medium gewechselt. Nach 6 bzw. 18 Stunden Zytokinbehandlung wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet. Ab Präparation N>10 wurden die Zellen an Tag 6 polarisiert und nach 18 Stunden für die Versuchsreihe verwendet. Die Wahl der Polarisationsdauer erfolgte im Einklang mit aktueller Literatur. [98] Der Erfolg der Polarisation wurde durch RT-PCR überprüft.

### **2.10.3 Behandlung der Makrophagen mit VSOP**

Für jede der drei Makrophagenpopulationen wurde eine Kontrollprobe entnommen, um den Eisengehalt unbehandelter Zellen als Referenzwert bestimmen zu können. Die polarisierten Zellen wurden mit 75 mM VSOP behandelt. Ein erneuter Mediumwechsel wurde bei den ersten zehn Versuchen nicht durchgeführt, die Zytokinwirkung hielt somit über die Dauer der Versuche bis zur Verarbeitung zu Zellpellets an. Nach 1, 3 und 6 Stunden wurden die Schalen mit 0,5 M EDTA-PBS-Lösung 5 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt und abgekratzt, die Zellzahl bestimmt, nach zweifachem Waschen mit PBS zu Pellets verarbeitet und bei -20°C eingefroren.

Ab Versuchsdurchführung Nr. 11 wurde für alle drei Subpopulationen vor Behandlung mit VSOP ein Mediumwechsel durchgeführt und somit die Zytokinstimulation arretiert. Weiterhin wurden die VSOP-Partikel auf ein neues Vollmedium (1% FCS, 1% P/S) gegeben. Hiermit wurde überprüft, ob und welchen Einfluss ein zehnfach niedrigerer Eiweißgehalt im Medium auf das Bindungsverhalten der Eisenpartikel hat.

### **2.10.4 Bestimmung von Proliferationsgeschwindigkeit und Apoptoserate von THP-1-Monozyten nach MPS-Messung**

THP-1-Monozyten wurden in RPMI-Vollmedium (10% FCS, 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin in Kultur gehalten. Nach Durchführung der MPS-Messungen an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt wurden die Zellen gewaschen und mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen in 5 ml Medium zusammen mit 10% FCS in T25 Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellzahl betrug  $n_1$  bei  $t_1 = 0$  h. Die Zellen wurden anschließend für 7 weitere Tage kultiviert. Die Zellzahl an Tag 7 wurde als  $n_2$  bei  $t_2 = 168$  h definiert. Doubling time ( $t_D$ ) wurde mit Hilfe der Formel  $t_D = \log 2 (t_2 - t_1) / (\log n_2 - \log n_1)$  berechnet. Trypanblau-Färbung wurde zur Bestimmung des Anteils an avitalen Zellen genutzt.

## **2.11 Proteinbiochemische und molekularbiochemische Methoden**

### **2.11.1 Photometrische Eisenbestimmung mit Phenanthrolin**

Zur Herstellung der Phenanthrolinhydrochloridlösung wurden 1,0 g 1,10-Phenanthrolinhydrochlorid-1-Wasser, 14 g Essigsäure >98% und 21,7 g Natriumacetat-trihydrat (Fluka #71190) in Wasser gelöst.

Mit PBS gewaschene Zellpellets wurden in 20 µl 35%-iger Salzsäure durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Anschließend wurde das Lysat durch Zugabe von 1 ml Aqua dest. verdünnt und 3 Minuten bei 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Um die gemessenen Absorptionswerte einer Eisenkonzentration zuordnen zu können, wurde eine Eisenverdünnungsreihe wie folgt hergestellt: 160 µl Fe-Standardlösung wurden mit 1840 µl Aqua dest. verdünnt, woraus sich ein Eisengehalt von 80 µg Fe/ml ergibt. Anschließend wurden jeweils 1 ml der Lösung abpipettiert und mit 1 ml Aqua dest. verdünnt, sodass sich eine Verdünnungsreihe von 80;40;20;10;5;2,5;1,25 µg/ml Eisengehalt ergibt. Als Nullreferenz diente 1 ml Aqua dest. + 20µl Salzsäure. Je Referenz\Verdünnungsreihe\Probe wurden jeweils 2x 50 µl des Überstands zur Messung in eine 96-Well-Platte vorgelegt. In jedes Well wurden 50 µl 10%-iges Hydroxylaminhydrochlorid und 150 µl Phenanthrolinhydrochlorid pipettiert und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Im Elisa-Reader wurde anschließend die Absorption bei 492 nm gemessen und mit den erhaltenen Werten anschließend die Eisenkonzentration der Proben rechnerisch bestimmt.

### **2.11.2 RNA-Isolierung**

Nach Abschaben der Zellen von den Kulturschalen erfolgte die RNA-Isolation gemäß den Herstellerprotokollen von ambion by life sciences (Trizolmethode) und ROTH (Roti®-Quick-Kit)

### **2.11.3 Herstellung von cDNA**

Für die Herstellung von cDNA wurde eine MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase benutzt. Mittels Reverser Transkriptase wird eine komplementäre DNA der RNA erstellt, um diese dann in der RT-PCR einzusetzen. Es wurden jeweils 500 ng der zuvor isolierten RNA verwendet und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 9 µl aufgefüllt. Die Herstellung erfolgte in folgenden Schritten:

**Tabelle 9: Herstellung von cDNA**

| <b>SCHRITT</b>                         | <b>REAGENZ</b>                  | <b>ZYKLUS</b>          |
|----------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1. DNA-Abbau                           | 0,5µl DNase (2 U/µl)            | 15 min 37°C; 5min 95°C |
| 2. Anlagerung<br>unspezifischer Primer | 2µl Hexamere (0,5 µg/µl)        | 10 min 70°C; 5 min RT  |
| 3. cDNA-Erststrangsynthese             | 4µl 5x PCR-Puffer               | 60 min 37°C            |
|                                        | 2µl DTT (0,1 M)                 |                        |
|                                        | 0,5µl RNase Inhibitor (40 U/µl) |                        |
|                                        | 1µl dNTP (10 mM)                |                        |
|                                        | 1µl MMLV (200 U/µl)             |                        |

Nach der Herstellung der cDNA wurde diese bis zur Verwendung in der Real Time quantitative PCR bei - 20°C gelagert.

#### 2.11.4 Real Time quantitative PCR

Um die Expression der gesuchten Gene nicht nur nachzuweisen, sondern auch zu quantifizieren, wurde die quantitative Real Time PCR mit TaqMan-Sonden verwendet. Das Verfahren beruht im Wesentlichen auf der Methode der herkömmlichen Polymerase Ketten Reaktion (PCR). Mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) können über eine steigende Fluoreszenz replizierte Nukleinsäuren gemessen werden. Zur Verwendung kommen mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte TaqMan-Sonden am 5' Ende des DNA-Strangs sowie Quencher-Sonden mit einem Donorfluorochrom am 3' Ende des DNA-Strangs. Die Fluoreszenz der TaqMan-Sonde wird durch das FRET-Prinzip durch den Quencher unterdrückt. Während des PCR-Zyklus baut die Taq-Polymerase den Quencher am 5'-Ende des DNA-Strangs ab. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr absorbiert und kann gemessen werden. Durch Relation mit einem Referenzgen kann anschließend eine Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgen.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Polarisation zum M1-Phänotyp wurde die Genexpression von TNF $\alpha$  (Mm00443260\_g1), zum M2-Phänotyp von MCP (Mm00441242\_m1) und Arginase 1

(Arg-1, Mm00475988\_m1) bestimmt. Als Referenzgen fungierte das ribosomale Protein L19 (RPL19; Mm02601633\_g1). Es erfolgte die Bestimmung der  $\Delta C_t$ - und  $2^{-\Delta C_t}$ -Werte, als erfolgreiche Polarisierung wurde ein Anstieg der Markergenexpression von Arg-1 um mindestens das 100-fache und von TNF- $\alpha$  um mindestens das 4-fache gewertet.

### **2.11.5 Durchflusszytometrische Charakterisierung des Zelltyps**

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine zeiteffiziente Identifizierung und Charakterisierung von Zellen. Während einzelne Zellen einer Suspension in hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl passieren, werden die dabei emittierten optischen Signale durch einen Detektor aufgezeichnet. Mit Hilfe von gekoppelten fluoreszierenden Antikörpern ist eine genaue Charakterisierung der Zelltypen möglich. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Erfolg der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen überprüft. Dafür wurden an Tag 7 der BMDM-Präparation die Zellen mit 1 ml PBS von den Zellkulturschalen gelöst, mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und F4/80 inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

## **2.12 Physikalisch-technische Methoden**

### **2.12.1 Bestimmung des Eisengehalts mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS)**

Die MPS-Messungen wurden an einem Magnetpartikelspektrometer an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt von Dr.-Ing. Norbert Löwa durchgeführt. Die MPS detektiert die nichtlineare Antwort magnetischer Nanopartikel im oszillierenden Magnetfeld. Ionisiertes Eisen in biologischem Material und Bluteisen beeinflussen das Signal nicht. Für die Messung werden PCR-Teströhrchen mit ca. 100  $\mu$ l Volumen in die Probenkammer des Magnetpartikelspektrometers platziert. Während der Messung ist die Probe einem starken, sinusoidalen oszillierenden Magnetfeld ausgesetzt (variable Amplitude  $B_{\text{excit}}$  bis zu 25 mT, Frequenz  $f_{\text{excit}} = 25$  Hz) und die nichtlineare Magnetisierbarkeit wird durch sog. „pickup coils“ gemessen (Sensitivität:  $5 \cdot 10^{12}$  Am<sup>2</sup>). Durch Signalfilterung und gradiometrisches Design der pickup coils wird die grundlegende Anregungsfrequenz unterdrückt. Die ungeraden Spektralkomponenten (ungerade Vielfache von  $f_{\text{excit}}$ ) der Fouriertransformation der Signalantwort bilden das MPS-Spektrum der magnetischen Nanopartikel. Alle Messungen wurden in einem 25 mT-Magnetfeld bei 36.6°C mit ca. 70  $\mu$ l unverdünntem Probenmaterial durchgeführt und durch vorher bestimmte Zellzahlen auf Eisengehalt pro Zelle berechnet. THP-

1-Monozyten wurden wie in 2.10.4 beschrieben in Zellkultur gehalten. Zur Differenzierung zu Makrophagen wurden die Zellen für 72 Stunden mit 20ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt und anschließend mit PBS gewaschen.

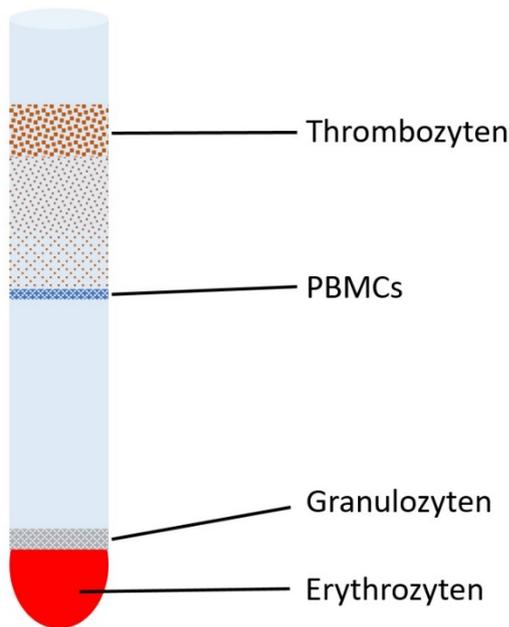
## 2.13 In Vivo-Versuche

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Die Tiere wurden in Kleintierkäfigen mit Dauerversorgung von Wasser und Nahrung sowie einem jeweils zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus in Einklang mit den Tierversuchsrichtlinien gehalten. Insgesamt 14 männliche, 10 Wochen alte LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse (Tierstamm: B6.129S7-Ldlrtm1Her/J; JAX Mice, Boston) erhielten eine stark fetthaltige „Western Type Diet“ für 20 Wochen mit folgenden Inhaltsstoffen: 21% Butterfett, 17% Casein, 0,21 % Cholesterin. Eine Dosis von 300 µmol/kg/KG VSOP wurde über Injektion in die Schwanzvene verabreicht. Jeweils zwei Tiere wurden an folgenden Zeitpunkten mittels Ausbluten unter Allgemeinanästhesie durch Isofluran geopfert: 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage. 2 Tiere erhielten keine VSOP-Injektion und dienten als Kontrolltiere. Das mittels Punktion im linken Ventrikel entnommene Blut wurde zur Isolierung von peripheren monozytären Zellen und Erythrozyten verwendet. Nach Punktion des linken Ventrikels erfolgte nach Eröffnung der Vena cava eine Perfusion mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung bei 37°C für eine Minute, um verbleibendes intravasales Blut zu entfernen. Zur Fixierung des Gewebes folgte anschließend eine Perfusion mit 4%-igem Paraformaldehyd, 0,05%-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Pufferlösung bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Anschließend erfolgte die Bildgebung der Aorta mittels Kleintier-MRT in-situ. Für die ex-vivo MRT-Aufnahmen wurden anschließend die großen Gefäße präpariert und in Agarose eingebettet. Zusätzlich erfolgte die Entnahme von Leber, Milz, Nieren, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel, Darm und viszeralem Fett für zukünftige Untersuchungen.

### 2.13.1 Isolierung der PBMC mittels Ficoll-Gradient

400 µl Lympholyte©-Mäuse-Ficoll wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäße vorgelegt. Mit Hilfe einer mit 0,5 M-EDTA-benetzten Spritze mit 21G-Kanüle wurde Mäusen unter tiefer Isoflurananästhesie transkardial Blut entnommen. Das entnommene Blut wurde vorsichtig auf die Ficolllösung geschichtet, sodass sich eine Blutphase an der Oberfläche bildete. Durch 15-

minütige Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge mit 1000 g erfolgte die Auftrennung des Blutes.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen des mittels Lympholyte© aufgetrennten Blutes

Die oberste Phase mit den darin befindlichen Thrombozyten wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt wurde der Großteil der Phase, in der sich die PBMC befinden, abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit PBS aufgefüllt. Der unterste Teil der Phase wurde belassen, um eine Verunreinigung mit Granulozyten zu vermeiden. Um das Mäuseficol zu entfernen, wurde dreimal mit PBS gewaschen. Für eine Eisenbestimmung mittels MPS wurde das Pellet in exakt 1 ml PBS resuspendiert, in einer Zählkammer die Zahl der peripheren Blutmonozyten bestimmt, abzentrifugiert und das Zellpellet bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dabei musste darauf geachtet werden, jeglichen Kontakt zu eisenhaltigen Materialien zu verhindern, um eine Kontamination durch Eisenspuren zu verhindern. Die Aufarbeitung der Erythrozyten erfolgte analog, diese wurden nach Auftrennung des Blutes mittels Lympholyte© aus der untersten Phase entnommen. Nach Isolierung der Erythrozyten wurden diese gemäß dem Einbettungsprotokoll für Elektronenmikroskopie behandelt. Die Einbettung der Erythrozytenproben sowie die Anfertigung entsprechender Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte durch Evelyn Ramberger im Rahmen ihrer Masterarbeit im Programm Molecular Medicine der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Für eine Untersuchung der PBMC mittels Elektronenmikroskopie wurde das Zellpellet für eine Stunde mit 250 µl 4% Glutaraldehyd behandelt. Anschließend wurde dieses für 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und die weitere Präparation gemäß dem Einbettungsprotokoll durchgeführt.

### **2.13.2 Probenaufbereitung für die Elektronenmikroskopie**

**Tag 1:** Die zu untersuchenden Gewebe-/Zellpellets wurden zweimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer (CP) gewaschen und anschließend 1 Stunde in 4 % Paraformaldehyd (PFA) und 4 % Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer bei pH=7.4 inkubiert. Nach 45 Minuten wurde für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um ein festes Zellpellet zu erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet dreimal mit 0,1 M CP gewaschen und in einen 3 ml-Glasbehälter gespült. Der Überstand wurde abgesaugt und die Proben unter einer Abzugshaube mit 1 ml 4 %-igem Osmiumtetroxid überschichtet, verschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Osmiumtetroxid abgenommen, verworfen und die Proben erneut dreimal mit CP und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Um den Proben das Wasser zu entziehen, wurde eine Alkoholverdünnungsreihe mit 1 ml 50 %-, 70 %-, 90 %-, 96 %- und 100 %-igem unvergällten Ethanol mit jeweils zweimal 5 Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Nun erfolgte eine Inkubation der Proben mit 1 ml Propylenoxid für dreimal 10 Minuten. Nachfolgend erfolgte die Inkubation in einem 1:1 Propylenoxid-Epon-Gemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend das Platzieren der Proben in einen Probenrotator mit frischer 1:1 Propylenoxid-Epon-Mischung über Nacht.

**Tag 2:** Zur Einbettung der Proben wurde eine Epoxidharzmischung wie folgt hergestellt: 10.7 g Epon Epoxidharz 812 und 7,8g DDSA wurden 10 Minuten gerührt, 6,5g Methyl-5-norbornene-2,3-dicarboxylicanhydrid (MNA) zugegeben und 5 Minuten gerührt. Zuletzt 0,5g 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30) dazupipettiert. In dem hergestellten Epoxidharz wurden die Proben jeweils zweimal 3 Stunden inkubiert und anschließend in frischer Epoxidharzmischung in Eppendorfgefäßdeckeln bei 60°C für 18 Stunden auspolymerisiert.

**Tag 3:** Das feste Epoxidharz wurde mit Hilfe einer Rasierklinge vorsichtig zu ca. 2 x 2 mm großen Rechtecken zugeschnitten. Die Harzblöcke wurden anschließend mit Sekundenkleber auf Plexiglaszylindern fixiert und 1 Stunde getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit Epoxid-2-Komponentenkleber fixiert. Die Plexiglaszylinder wurden in ein Ultramikrotom (Leica Ultracut)

gespannt und Ultradünnschnitte (60nm) der Proben angefertigt. Der intakte Ultradünnschnitt wurde anschließend auf ein Kupfergrid gelegt und im Transmissionselektronenmikroskop platziert.

### **2.13.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die aus murinem Vollblut isolierten PBMC wurden nach dem bereits beschriebenen Standardprotokoll für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Mit dem Elektronenmikroskop (EM Zeiss 912) wurden die in den Proben enthaltenen monozytären Zellen identifiziert und auf ihren Partikelgehalt untersucht. Nicht vollständig abgebildete Zellen wurden nicht analysiert. Um kleinere Partikelansammlungen nicht zu verfehlen, wurden die Zellen Stück für Stück abgefahren. Für jeden Zeitpunkt (t = 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage) wurden 100 Zellen ausgezählt. Um diese Anzahl zu erreichen, wurden verschiedene nicht direkt benachbarte Ultradünnschnitte der PBMC-Zellpellets dargestellt. Außerdem wurden die Zellen auf mögliche sichtbare Aufnahmeprozesse, wie z.B. Zellausläufer oder Transzytoseprozesse, untersucht. Für jede partikelpositive Zelle wurden die Anzahl der partikelenthaltenden Vesikel gezählt und die durchschnittliche Vesikelzahl mit Partikeln pro Zeitpunkt bestimmt.

### **2.13.4 Magnetresonanztomographie in-situ und ex-vivo**

Die MRT-Aufnahmen erfolgten an einem 7 Tesla MRT (BioSpec 70/20 USR scanner Bruker, Billerica, MA) in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Boehm-Sturm und Susanne Müller aus der Abteilung für experimentelle Neurologie, Charité Universitätsmedizin Berlin. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde eine 1H-CryoProbe Spule (Bruker) genutzt. Nach Behandlung und Opferung der Tiere nach obengenanntem Protokoll wurden zunächst in-situ-Bildaufnahmen der retrograd perfundierten Versuchstiere angefertigt. Zur Anfertigung von FLASH 2D Sequenzen wurden folgende Parameter genutzt: field of view (FOV) = 25 × 25 mm; repetition time (TR)/echo time (TE) = 250 ms/3.5 ms, flip angle (FA) = 30°, 6 averages (NEX), matrix dimension (MD) 256 × 256, 20 consecutive 0.3 mm thick slices, acquisition time (TA) = 4 min and 18 s. Anschließend wurden aufsteigende Aorta, Aortenbogen mit Truncus braciocephalicus, linker A. carotis communis und linker A. subclavia sowie die absteigende thorakale Aorta präpariert und in 1%-ige Agarose in einem 15 ml Falcon® Gefäß für ex-vivo MRT-Aufnahmen eingebettet. Zur Anfertigung von FLASH 3D Sequenzen wurden folgende Parameter genutzt: FOV = 19.2 × 19.2 × 16 mm; TR/TE = 36.5 ms/8 ms, FA = 20°, NEX = 2, MD 192 × 192 × 160;

TA = 42 min and 2 s. Eine semiquantitative Analyse der MRT-Bilder zur Untersuchung der VSOP-Aufnahme in atherosklerotische Plaques erfolgte unter Nutzung einer FLASH 3D Pulssequenz mit folgenden Parametern: FOV = 19.2 mm<sup>3</sup>, TR/TE = 31 ms/8 ms, FA = 20°, NEX = 1, MD 192 × 192 × 192; TA = 21 min and 25 s.

## 2.14 Statistik

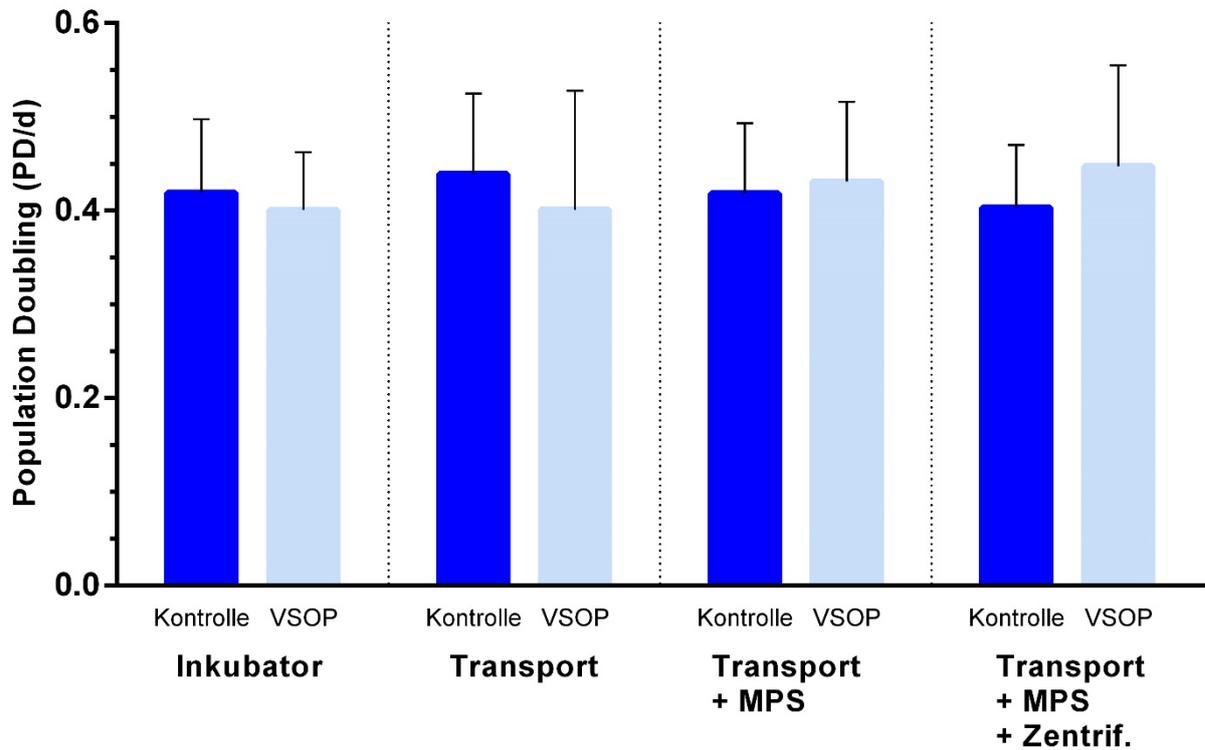
Die Daten wurden mit Hilfe von Graphpad Prism Version 6.01 mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Um die mittels Phenanthrolin-Assay bestimmten Eisenkonzentrationen für jeden Zeitpunkt miteinander zu vergleichen, wurde eine Multivarianzanalyse mittels 2Way-ANOVA-Test durchgeführt. Auch die Ergebnisse zur Bestimmung der Zellvitalität sowie Apoptoseraten sowie Unterschiede in der Bestimmung der Eisenkonzentration von Monozyten und Makrophagen mittels Phenanthrolin-Assay beziehungsweise Magnetpartikelspektroskopie nach Behandlung mit VSOP wurden mittels 2Way-ANOVA-Test analysiert. Die Daten wurden angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung (SD).

### **3 Ergebnisse**

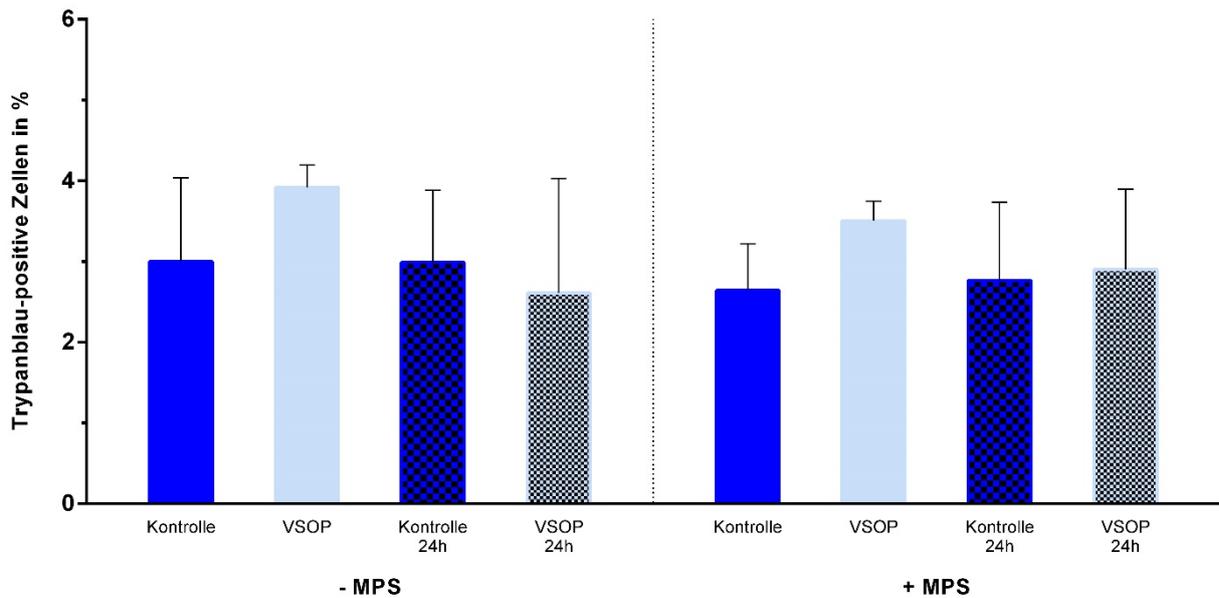
#### **3.1 Aufnahme von VSOP in Makrophagen und Monozyten**

##### **3.1.1 Zentrifugation, Transport und MPS-Messung haben keine Auswirkungen auf die Zellvitalität**

Da sich das Magnetpartikelspektroskop an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin befindet, die Zellkulturversuche jedoch im Center for Cardiovascular Research am Campus Charité Mitte durchgeführt wurden, musste ein möglicher Effekt von Transport zur Physikalisch-Technischen Bundesanstalt, Inkubation, Zentrifugation sowie Rücktransport auf die Vitalität der Zellen als Grundvoraussetzung für nachfolgende Versuche ausgeschlossen werden. Eine Veränderung der Vitalität durch die Messung selbst wurde ebenfalls untersucht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, konnte in unseren Versuchen keine Auswirkung auf die Zellvitalität im Sinne einer Reduktion der Zeit, die eine Zellpopulation benötigt, um die Zellzahl zu verdoppeln (= Populationsverdopplungszeit, „population doubling time“), festgestellt werden. Weder Transport/Rücktransport, Zentrifugation, noch die MPS-Messung selbst beeinflussten die gemessene Vitalität der Zellen. Ebenso war der Anteil Trypanblau-positiver Zellen zu den nicht einer MPS-Messung ausgesetzten Kontrollzellen vergleichbar.



**Abbildung 5:** Einfluss von Transport und Messung mittels Magnetpartikelspektroskope (MPS) auf die Zellproliferation von THP-1-Monozyten. Für diesen Versuch wurde die Zeit zur Verdopplung der Zellpopulation mit und ohne Behandlung mit VSOP nach Inkubation, Transport aus dem biologischen Forschungslabor der Charité zur Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin und zurück, MPS-Messung ( $t = 30$  s,  $B_{excit} = 25$  mT,  $f_{excit} = 25$  kHz) sowie Zentrifugation bestimmt.  $N= 3$  je Kontroll- und Versuchsgruppe, Mittelwert + Standardabweichung.

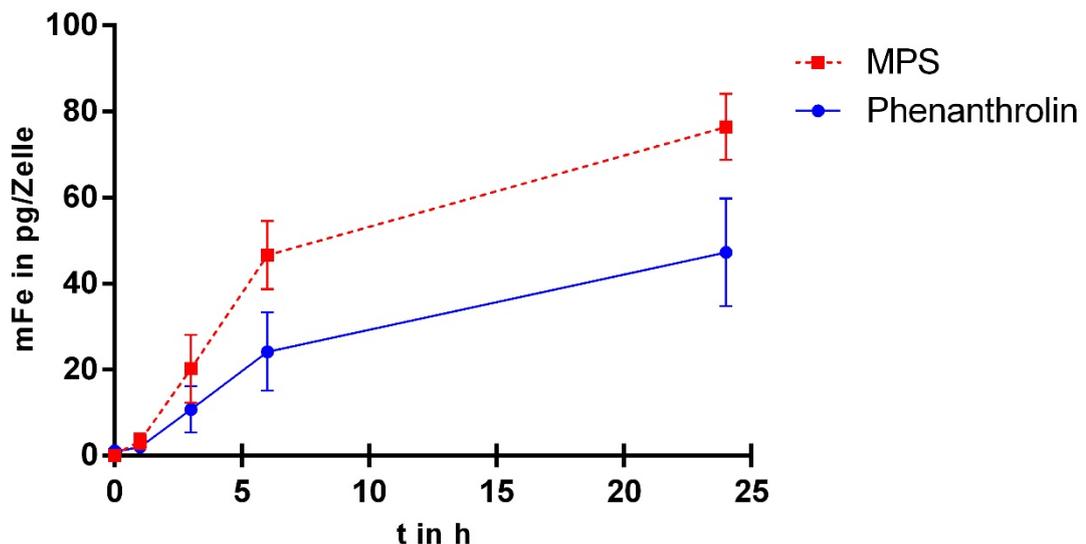


**Abbildung 6:** Einfluss der Messung mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) auf die Apoptose von THP-1-Monozyten. Für diesen Versuch wurden mit 75 mM VSOP behandelte und unbehandelte Zellen (Kontrolle) mit Trypanblau zur Bestimmung der Zellvitalität nach Durchführung der MPS-Messung bzw. ohne MPS-Messung jeweils nach 1 Stunde und 24 Stunden angefärbt. In der linken Bildhälfte ist der Anteil der trypanblaupositiven Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl ohne erfolgte MPS-Messung dargestellt, in der rechten Bildhälfte die Zellpopulationen, die einer MPS-Messung ausgesetzt waren. Die MPS-Messungen erfolgten an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin (Messparameter:  $t = 30$  s,  $B_{excit} = 25$  mT,  $f_{excit} = 25$  kHz).  $N = 4$  je Kontroll- und Versuchsgruppe, Mittelwert + Standardabweichung.

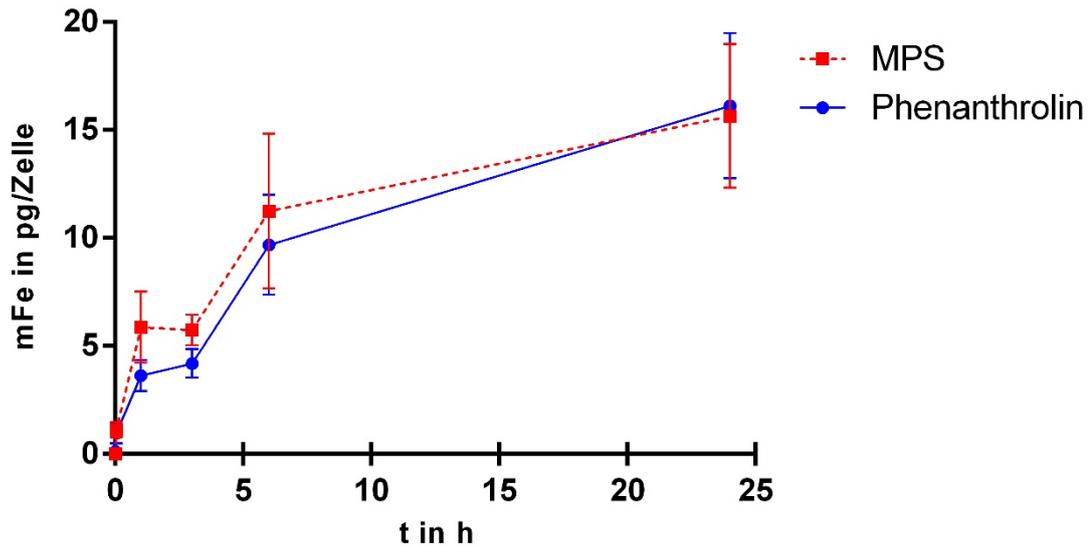
### 3.1.2 Die Magnetpartikelspektroskopie erlaubt eine genaue Quantifizierung des Eisengehaltes

Um die Magnetpartikelspektroskopie als Verfahren zur Eisenquantifizierung zu validieren, wurde eine Verdünnungsreihe in Aqua dest. mit VSOP-Partikeln hergestellt und die identischen Proben erst mittels MPS und anschließend photometrisch quantifiziert. Hierfür wurde die Eisenquantifizierung mittels Phenanthrolin als Referenz genutzt. Beide Verfahren zeigten eine sehr genaue Korrelation der Messwerte. Bei Eisenmengen unter 500 ng lieferte die Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay ungenauere Daten, während die MPS-Messung valide Daten bis zu einer Nachweisgrenze von 91 ng lieferte, was die Probe mit der niedrigsten Eisenkonzentration darstellte. Das  $A_5/A_3$ -Verhältnis war bei der Verdünnungsreihe stets konstant (Mittelwert 18,1 %). In einer weiteren Testreihe wurde die Eignung von MPS zur korrekten Eisenquantifizierung von lebenden Zellen untersucht. Dafür wurden THP-1-Monozyten und Makrophagen mit einer

75 mM Lösung VSOP über definierte Zeiträume behandelt ( $t = 3$  Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden) und anschließend zu Pellets verarbeitet. Die nachfolgende Eisenquantifizierung mittels MPS wurde dann mit der photometrischen Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay verglichen. Da für eine Messung mittels Phenanthrolinmethode eine Lyse der Proben mit Salzsäure notwendig ist, kann diese im Gegensatz zur MPS nur an avitalen Messproben durchgeführt werden. Die Quantifizierung des Eisengehalts durch MPS ergab für nahezu alle Proben einen höheren Wert im Vergleich zur photometrischen Bestimmung. Die gemessene Differenz fiel in THP-1-Makrophagen deutlich höher aus als in THP-1-Monozyten. Der mittels Phenanthrolinmethode gemessene Eisengehalt lag in Makrophagen nach einer Stunde bei 47 % unter dem mittels MPS gemessenen Wert, mit zunehmender Dauer der Zellbehandlung verminderte sich die Differenz des gemessenen Eisengehalts der Makrophagen auf 39 %. Bei Monozyten zeigte sich initial nach 3 Minuten eine Messdifferenz von 38,37 %, die sich mit 26,7 % nach 3 Stunden, 13,9 % nach 6 Stunden und 3 % nach 24 Stunden zunehmend angleich.

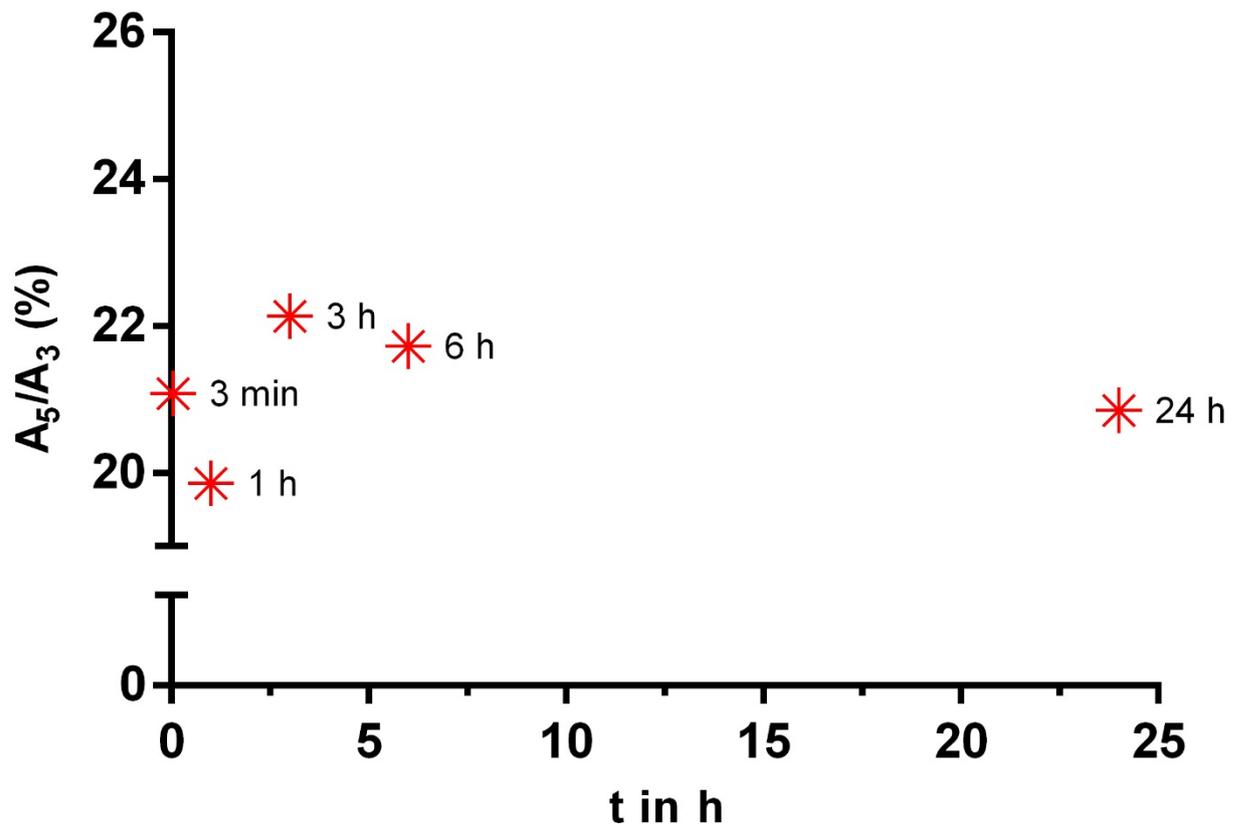


**Abbildung 7:** Vergleich der Eisenquantifizierung von Makrophagen durch Magnetpartikelspektroskopie (MPS) und photometrischer Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay. THP-1-Makrophagen wurden mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) für 3 Minuten, 1 Stunde, 6 Stunden und 24 Stunden behandelt und anschließend der Eisengehalt zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.  $N=3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Messdaten aus 3 unabhängigen Versuchen.

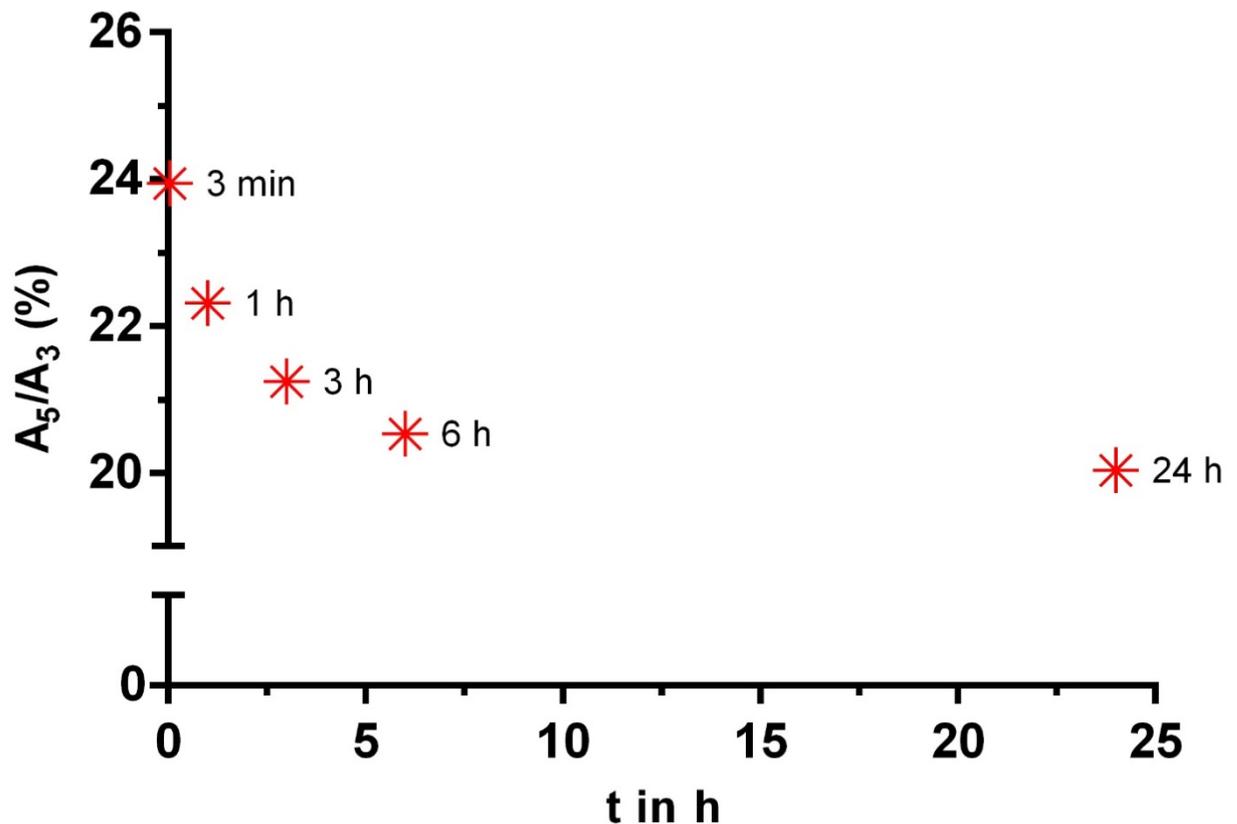


**Abbildung 8:** Vergleich der Eisenquantifizierung von Monozyten durch Magnetpartikelspektroskopie (MPS) und photometrischer Bestimmung mittels Phenanthrolin-Assay. THP-1-Monozyten wurden mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) für 3 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden behandelt und anschließend der Eisengehalt bestimmt. N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Um die offensichtlichen Unterschiede in der Eisenquantifizierung weiter zu untersuchen, bestimmten wir ebenfalls das  $A_5/A_3$ -Verhältnis der Zellen, welches ein Parameter für das Verhalten der Zellen im oszillierenden Magnetfeld ist. Eine Veränderung des Verhältnisses wirkte sich direkt auf die Quantifizierung der Zellen aus. Im Vergleich zur VSOP-Suspension in wässriger Lösung (18,1 %) war das  $A_5/A_3$ -Verhältnis in Zellkulturmedium 18,3 % an  $t = 0$  und somit nur minimal verschieden. Bei Inkubation von VSOP mit THP-1 Monozyten kam es innerhalb von 3 Minuten zu einem starken Anstieg des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses auf bis zu 23,6 %, mit einem nachfolgend steten Abfall auf 20 %. Für THP-1-Makrophagen ließ sich nach einem Anstieg des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses auf 21,4 % nach 3 Minuten ein Abfall auf 20,1 % nach einer Stunde beobachten. Danach folgten ein erneuter Anstieg auf 22,2 % nach 3 Stunden und ein erneuter Abfall mit Angleichung an Werte der Monozytenpopulation auf 20,9 % nach 24 Stunden. Nach 3 Stunden kam es im weiteren Verlauf bis 24 Stunden nach Behandlung mit VSOP zu einer steten Abnahme des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses.



**Abbildung 9:** Darstellung des A<sub>5</sub>/A<sub>3</sub>-Verhältnisses über den Versuchszeitraum nach Behandlung von Makrophagen mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP). Die Behandlung der Makrophagen erfolgte für 3 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden. Die Bestimmung des A<sub>5</sub>/A<sub>3</sub>-Verhältnisses erfolgte mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin. Darstellung einer repräsentativen Messung.



**Abbildung 10:** Darstellung des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses über den Versuchszeitraum nach Behandlung von Monozyten mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP). Die Behandlung der Monozyten erfolgte für 3 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden. Die Bestimmung des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses erfolgte mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin. Darstellung einer repräsentativen Messung.

Es ließ sich eine lineare Korrelation in der Abweichung des gemessenen Eisengehalts und der Veränderung des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses feststellen, sodass in weiteren Untersuchungen die Entwicklung einer Korrekturformel möglich war, die eine Korrelation der Eisenquantifizierung mittels MPS und Phenanthrolin-Assay mit sehr hoher Genauigkeit ermöglichte ( $R^2 = 0,988$ ). [99]

## **3.2 Einfluss des Makrophagenphänotyps auf die Aufnahme von VSOP**

### **3.2.1 Durchflusszytometrie bestätigte die Reinheit der Makrophagenpopulation**

Durch die Isolation von primären Makrophagen aus murinem Knochenmark konnten pro Versuchstier durchschnittlich ca. 43 Millionen Zellen gewonnen werden. Aufgrund bakterieller Kontamination musste eine von 13 Präparationen verworfen werden. Im Verlauf der Differenzierung der Zellen zu Makrophagen reduzierte sich die Zellzahl durchschnittlich um 77,46 %.

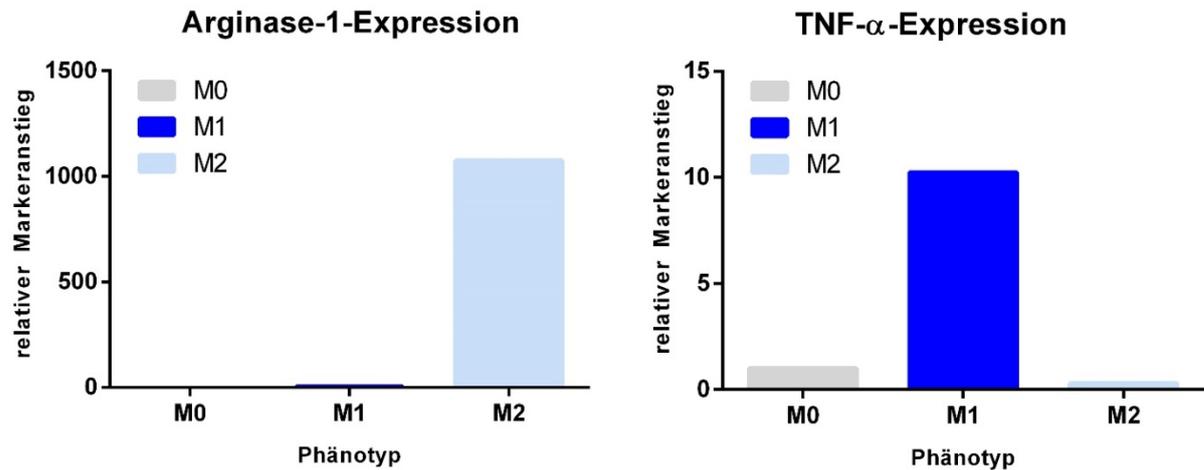
Um die primären Makrophagen aus der Vielzahl der sich im Knochenmark befindlichen Zellen zu selektieren, wurde deren Eigenschaft der Oberflächenadhäsion genutzt. Durch mehrfaches Waschen mit PBS während der einwöchigen Inkubationsperiode wurden nichtadhärente Zellen aus den Zellpopulationen entfernt. Als Korrelat zur Reifung zu ausdifferenzierten Makrophagen bildeten diese unter dem Mikroskop sichtbare Zellausläufer. Um die angezüchteten Zellen zu charakterisieren, wurden diese mit PBS verdünnt und anschließend mit dem Durchflusszytometer untersucht. Die Bestimmung der Zellart und –differenzierung erfolgte anhand verschiedener Oberflächenmarker. Integrin  $\alpha$ -M (CD11b) ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird insbesondere von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gebildet.[100] CD45 (auch PTPRC, LCA, T200) ist eine Tyrosinphosphatase, die in allen Leukozyten zu finden ist. Als Marker ausgereifter Makrophagenpopulationen wurde EMR1 bzw. F4/80 genutzt, ein Protein, das mit hoher Spezifität auf murinen Makrophagenpopulationen zu finden ist. [101]

Unsere Analyse der Zellen bestätigte analog zu den von Zhang et. al. 2008 publizierten Ergebnissen [102] die Reinheit der gezüchteten Makrophagen.

### **3.2.2 Eine Behandlung mit IFN- $\gamma$ und IL-4 führte zu einer Differenzierung der Makrophagen**

Die aus murinem Knochenmark gewonnenen primären Makrophagen wurden in einem Nährmedium zusammen mit IFN- $\gamma$  zur Differenzierung in M1-Makrophagen und IL-4 zur Differenzierung zu M2-Makrophagen kultiviert. Diese beiden Zytokine sind klassische Induktoren für die Differenzierung in die M1- bzw. M2-Subtypen. [41] Für jeden Versuch musste die Polarisierung mit typischen Expressionsmarkern mittels PCR untersucht werden. Als erfolgreiche Polarisierung wurde ein Markeranstieg von Arg-1 um mindestens das 100-fache und

von TNF- $\alpha$  um mindestens das 4-fache gewertet, was auf 7 von 12 Versuchsdurchführungen zutraf. Nur Makrophagen mit entsprechendem Expressionsprofil wurden für weitere Analysen der Eisenaufnahme in den Subpopulationen genutzt.

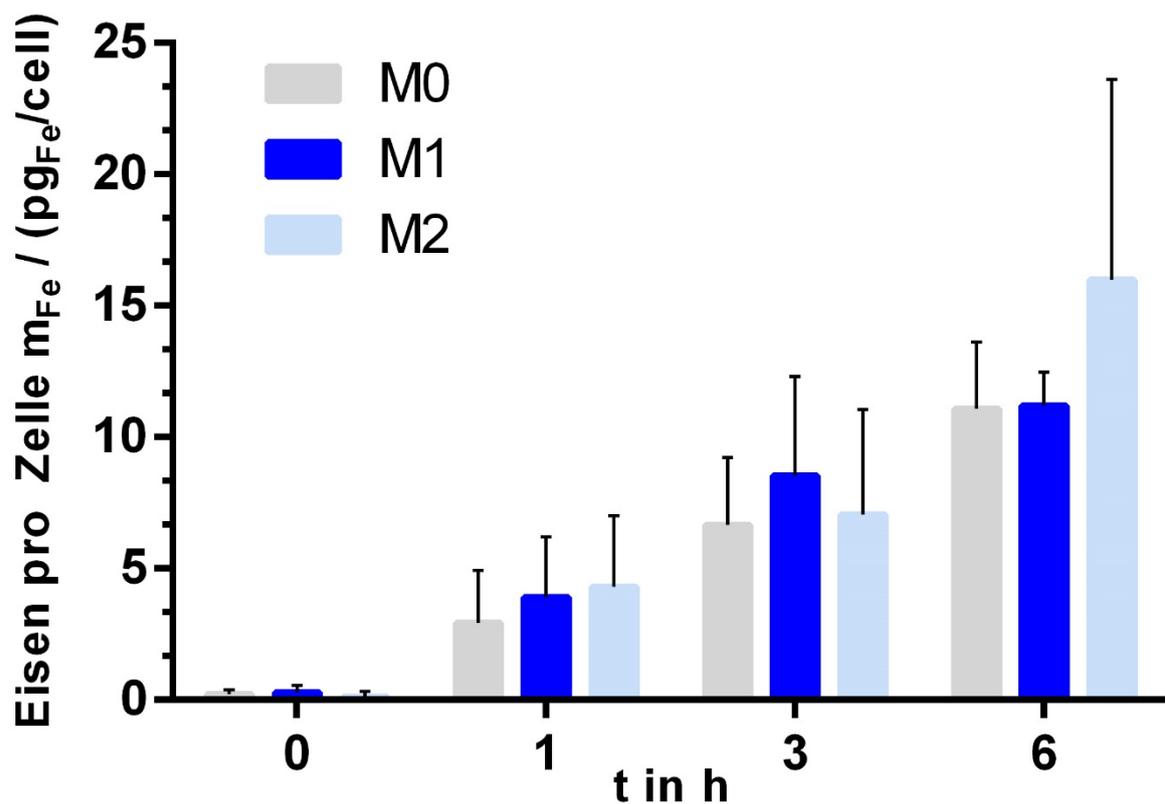


**Abbildung 11:** Expression von Markergenen in verschiedenen Makrophagenphänotypen nach Behandlung der primären Makrophagen mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  (M1) bzw. 5 U/ml IL-4 (M2). Die Ergebnisse der Messungen zeigen eine  $\sim$ 1000-fach höhere Expression von Arginase-1 im M2-Phänotyp und eine  $\sim$ 10-fach höhere Expression von TNF- $\alpha$  im M1-Phänotyp verglichen mit der Kontrollgruppe (M0). RT-PCR-Ergebnisse einer repräsentativen Messung.

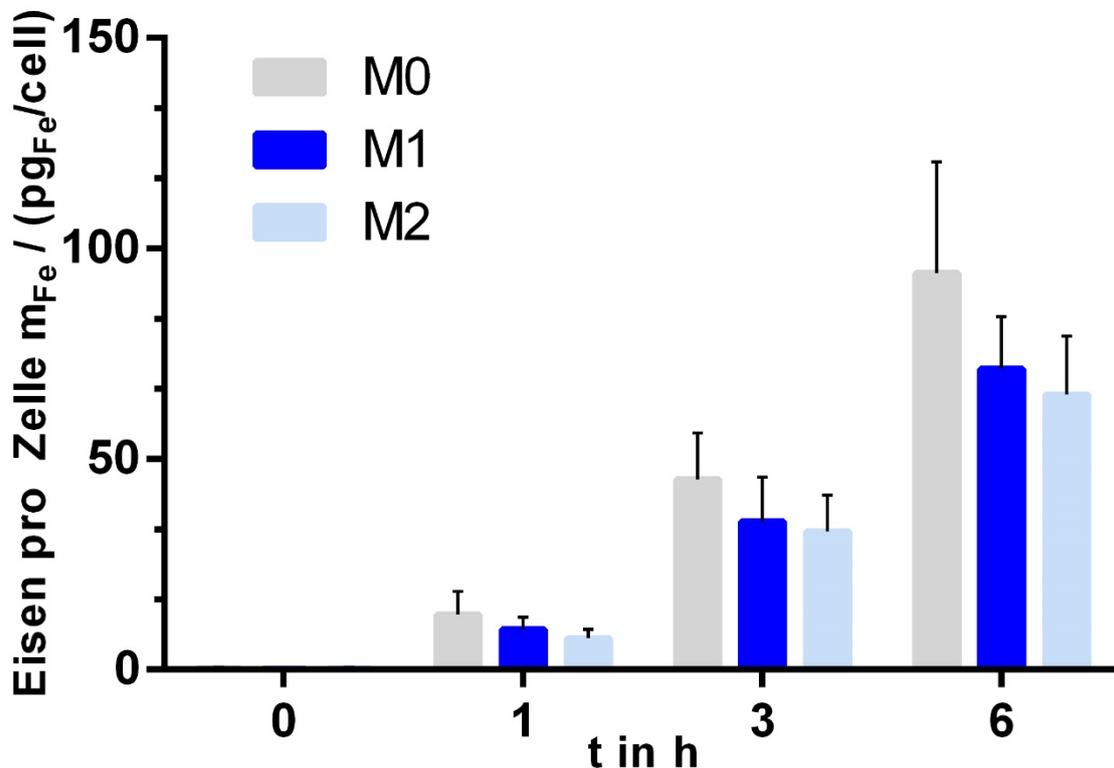
### 3.2.3 Der Makrophagenphänotyp hat keinen Einfluss auf die VSOP-Aufnahme

Die Polarisierung der Makrophagen in die M1- bzw. M2-Population verändert die Expression einer Vielzahl von Genen, die an der Regulation des Eisenstoffwechsels, dem Zelltransport und der Expression von Zelloberflächenmolekülen wie z.B. Glykosaminoglykanen beteiligt sind. [103] Daher ließ sich eine veränderte Aufnahme von elektrisch stabilisierten Nanopartikeln innerhalb der verschiedenen Subpopulationen vermuten. Für unsere Versuchsreihe wurden die polarisierten Makrophagen mit VSOP über definierte Zeiträume inkubiert, die Zellen zu Pellets verarbeitet und anschließend der Eisengehalt photometrisch bestimmt. An  $t = 0$ , der den Zeitpunkt vor Behandlung der Zellpopulationen mit Partikeln darstellt, war photometrisch kein Eisengehalt in den Zellen nachzuweisen. Der Eisengehalt stieg in allen Phänotypen bis 6 Stunden nach Behandlung kontinuierlich an, eine Sättigung war nicht zu beobachten. Es ließ sich

quantitativ kein signifikanter Unterschied in der Eisenaufnahme in proteinreichem Medium (10 % FCS) innerhalb der proinflammatorischen M1-, der antiinflammatorischen M2- und der unbehandelten Makrophagenpopulationen M0 beobachten. Die Makrophagen, die in proteinarmer Lösung (1 % FCS) suspendiert und anschließend mit VSOP behandelt wurden, zeigten einen über alle Phänotypen gemittelten, um 5,8-fach erhöhten Eisengehalt. Es zeigte sich auch in proteinarmer Lösung (1 % FCS) weiterhin kein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der proinflammatorischen M1- und der antiinflammatorischen M2-Phänotypen. Lediglich in der nativen, unbehandelten M0-Population ließ sich sowohl im Vergleich zur M1- als auch zur M2-Population ein statistisch signifikant erhöhter Eisengehalt nach 6 Stunden feststellen. Bei  $t = 0, 1$  oder 3 Stunden war diese Differenz nicht zu beobachten.



**Abbildung 12:** Eisengehalt pro Zelle in M1-, M2- und M0-Makrophagen nach Behandlung mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in proteinreicher Lösung (10 % FCS). Der Eisengehalt pro Zelle wurde mittels Phenanthrolin-Assay nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden ermittelt. Der Zeitpunkt  $t = 0$  diente als Kontrolle.  $N = 4$ , Mittelwert + Standardabweichung



**Abbildung 13:** Eisengehalt pro Zelle in M1-, M2- und M0-Makrophagen nach Behandlung mit 75 mM very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in proteinarmer Lösung (1 % FCS). Der Eisengehalt pro Zelle wurde mittels Phenanthrolin-Assay nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden ermittelt. Der Zeitpunkt  $t = 0$  diente als Kontrolle.  $N = 4$ , Mittelwert + Standardabweichung

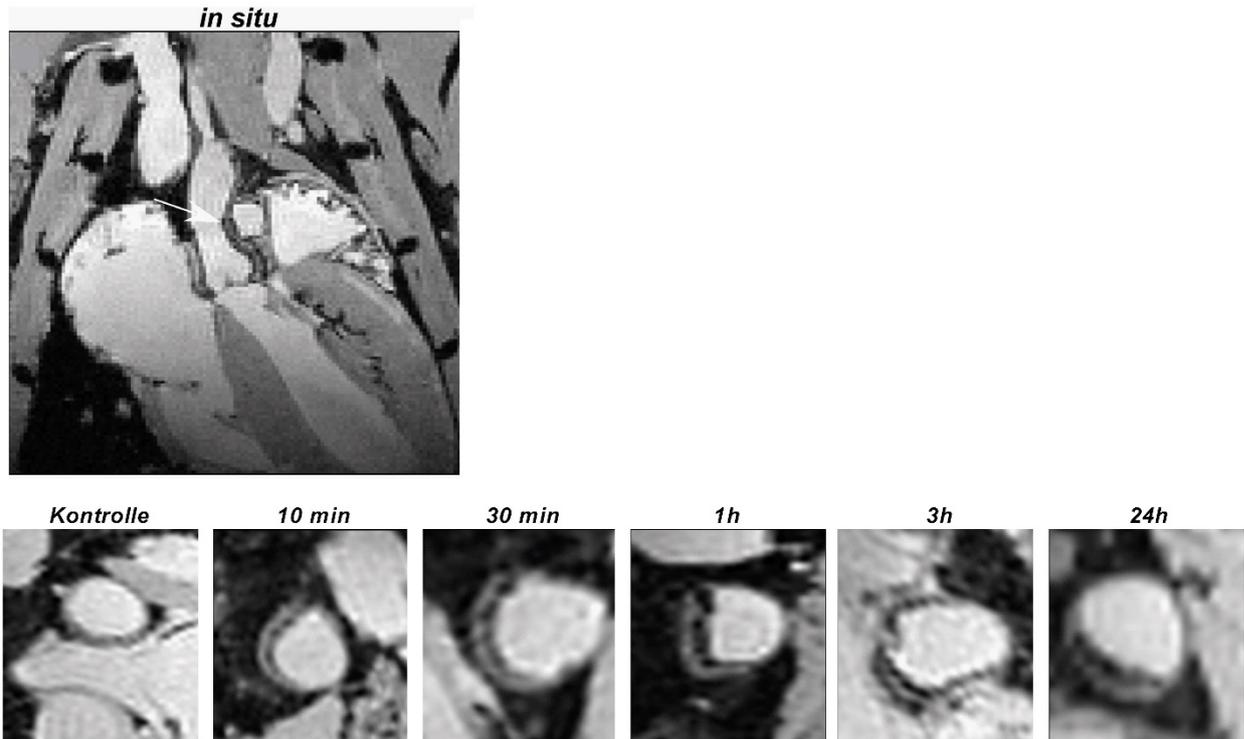
### 3.3 Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen

#### 3.3.1 Murine atherosklerotische Plaques zeigen eine schnelle Anreicherung von VSOP nach intravenöser Injektion

Voraussetzung für die klinische Anwendbarkeit von VSOP als MR-Kontrastmittel zur Darstellung atherosklerotischer Plaques ist nicht nur die Aufnahme in Zellen, die Bestandteile der Plaques darstellen, sondern auch, ob die Aufnahme ausreichend ist, um einen entsprechenden Kontrast in den MRT-Bildsequenzen zu erzeugen. Nachdem wir bereits zeigen konnten, dass sowohl Monozyten als auch native Makrophagen VSOP zügig aufnehmen, führten wir in-vivo

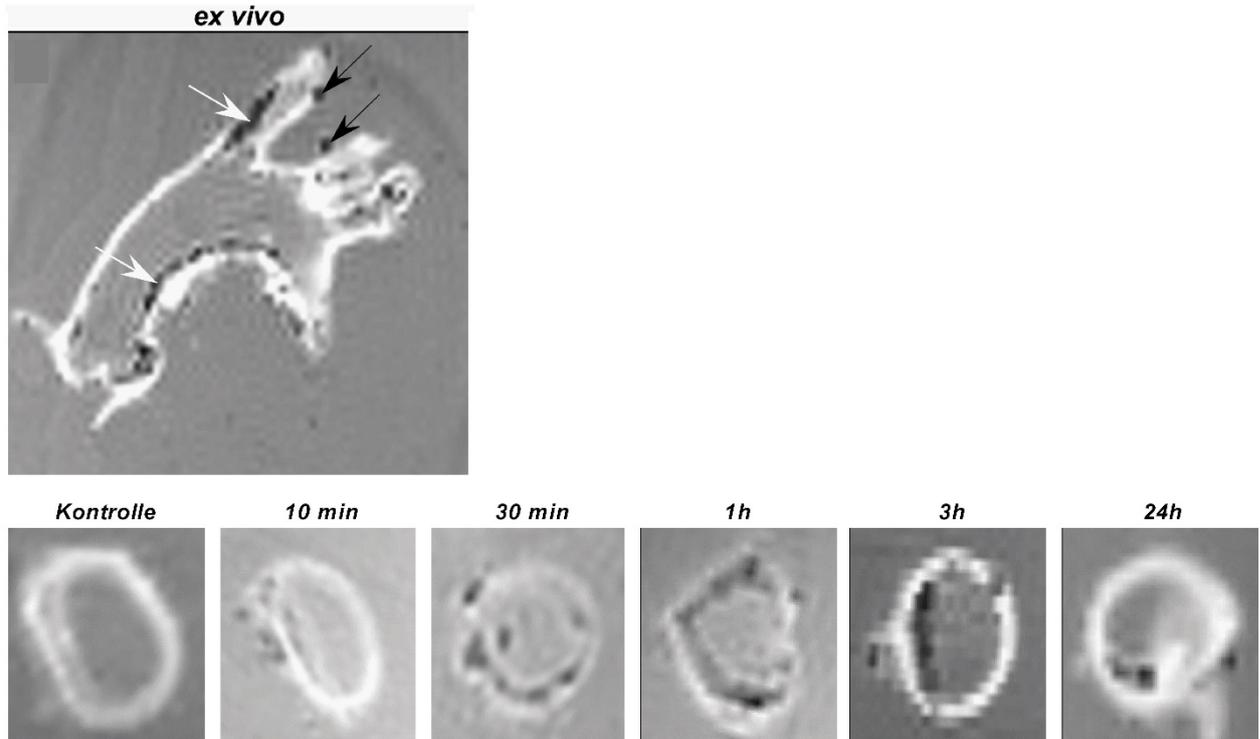
Versuche mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen mit anschließender post-mortem MRT-Bildgebung durch. So konnten wir den für die Aufnahme von VSOP verantwortlichen Mechanismus weiter eingrenzen und überprüfen, ob VSOP ein bildmorphologisches Korrelat der Partikelaufnahme erzeugen. Die Tiere erhielten zuvor eine hochkalorische Diät für 20 Wochen. Nach venöser Applikation von VSOP (300  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht) über die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen mit fortgeschrittener Atherosklerose untersuchten wir die atherosklerotischen Plaques der geopferten Tiere 10 Minuten bis 24 Stunden nach Injektion. Dafür kombinierten wir T2\*-gewichtete MRT-Aufnahmen der thorakalen Aorta in-situ und ex-vivo. Da VSOP eine Bluthalbwertszeit von ca. 20 - 30 Minuten besitzen und in vitro eine sehr schnelle Aufnahme in Monozyten und Makrophagen innerhalb von wenigen Minuten zu beobachten ist, war ein besonderes Versuchsprotokoll notwendig. Da in frühen Zeitpunkten nach Injektion die Visualisierung der Gefäßwände durch hohe intravasale VSOP-Konzentrationen erschwert ist und um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch aktive Stoffwechselprozesse und eine fortschreitende VSOP-Aufnahme während der ca. 30-minütigen MRT-Untersuchung zu eliminieren, führten wir die Untersuchungen post-mortem und mit blutleerem Gefäßsystem durch. Dies erreichten wir über eine Gewebefixation durch retrograde Perfusion mit Formaldehydlösung nach Kanülierung des rechten Herzventrikels unmittelbar nach Opferung des Versuchstiers. So konnten verbliebene intravasale Nanopartikel eliminiert und die Aufnahme der Nanopartikel arretiert werden, was insbesondere relevant zur Untersuchung von sehr frühen Zeitpunkten innerhalb der ersten zwei Bluthalbwertszeiten war. Durch Einbettung der präparierten Aortenbögen ex-situ in Agarose erreichten wir eine bessere Diskriminierung der Plaquebereiche von umgebendem Weichteilgewebe.

Das durch intrakardiale Punktion aus dem rechten Ventrikel gewonnene Vollblut wurde durch Lympholyte® in Phasen aufgetrennt und die peripheren monozytären Blutzellen der Versuchstiere elektronenmikroskopisch auf ihren Anteil VSOP-haltiger Zellen und eine gegebenenfalls erkennbare Kinetik, wie in 3.2.2. beschrieben, untersucht.



**Abbildung 14:** T2\*-gewichtete in situ MRT-Aufnahmen der thorakalen Aorta von LDL-R-Rezeptor-defizienten Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP). Nach Injektion der VSOP mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  wurden die Tiere nach 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden geopfert und das Gefäßsystem mit Formaldehyd retrograd über den rechten Ventrikel perfundiert. Post-mortem in situ MRT einer repräsentativen Darstellung der Aorta ascendens und des Aortenbogens 3 Stunden nach Injektion der Nanopartikel. (oberer Bildbereich) Die Signalauslöschung durch VSOP zeigt sich besonders deutlich im Bereich der inneren Krümmung des Aortenbogens (weißer Pfeil).

In unseren Untersuchungen zeigte sich ein negativer Kontrast als Signalauslöschung in den T2\*-gewichteten Sequenzen in atherosklerotischen Plaques (s. Abb. 14). Diese war bereits 10 Minuten nach Injektion der Partikel nachweisbar und erreichte sein Maximum 3 Stunden nach Injektion. Auch im Kontrolltier ohne Partikelinjektion ließen sich die atherosklerotischen Plaques identifizieren, es zeigte sich jedoch in diesem Bereich keine Signalauslöschung. Die Partikelansammlungen fanden sich an Orten, die als Prädilektionsstellen für die Ausbildung atherosklerotischer Plaques gelten, wie der Aortenursprung aus dem linken Ventrikel, die kleine Krümmung des Arcus aortae und der Truncus brachiocephalicus.



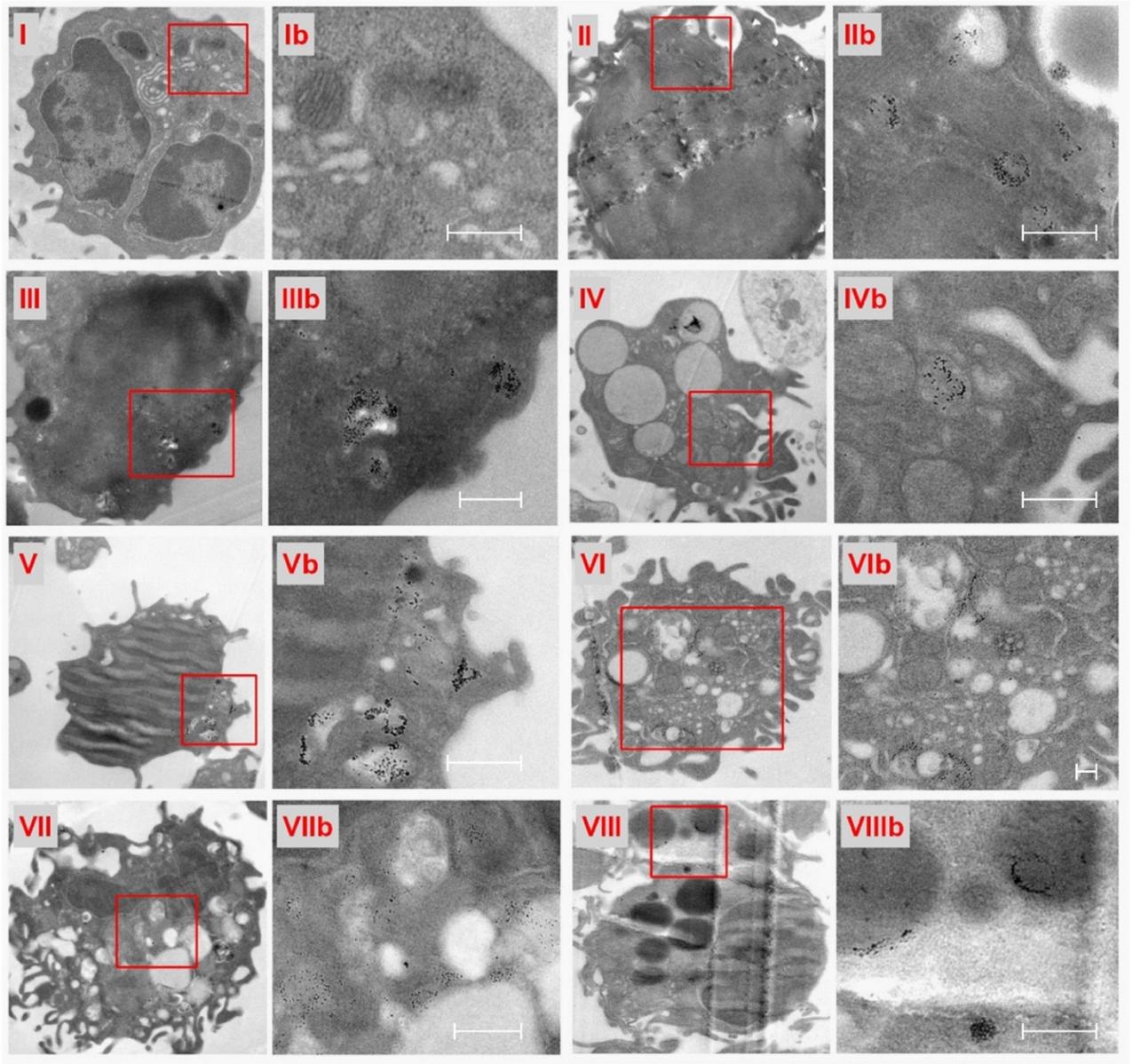
**Abbildung 15:** T2\*-gewichtete ex-situ MRT-Aufnahmen der thorakalen Aorta von LDL-R-Rezeptor-defizienten Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP). Nach Injektion der VSOP mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  wurden die Tiere nach 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden geopfert und das Gefäßsystem mit Formaldehyd retrograd über den rechten Ventrikel perfundiert. Anschließend erfolgte die Dissektion des Aortenbogens und Einbettung in Agarosegel. Post-mortem ex-situ MRT einer repräsentativen Darstellung der Aorta ascendens und des Aortenbogens 3 Stunden nach Injektion der Nanopartikel (oberer Bildbereich). Die Signalauslöschung durch VSOP zeigt sich besonders deutlich im Bereich der inneren Kurvatur des Aortenbogens sowie des Truncus brachiocephalicus (weiße Pfeile). Signalauslöschungen extravasal sind durch kleine Luftbläschen im Agarosegel bedingt (schwarze Pfeile).

Nach Thorakotomie, Konservierung des Gewebes durch retrograde Perfusion mit Glutaraldehyd und Blutentleerung untersuchten wir Querschnitte der thorakalen Aorta mittels ex-vivo MRT-Aufnahmen (s. Abb. 15). Hier konnte die zuvor auch in den in-situ-Aufnahmen beobachtete Signalauslöschung zentralen Plaquebereichen zugeordnet werden. Da sich Luft ähnlich der Nanopartikel durch eine Signalauslöschung darstellt, sind in den in Agarosegel eingebetteten Querschnitten auch extravasale Auslöschungsartefakte feststellbar (s. Abb. 15 schwarze Pfeile). Makroskopisch ließen sich diese Signale jedoch eindeutig von den Nanopartikeln in Plaquebereichen unterscheiden.

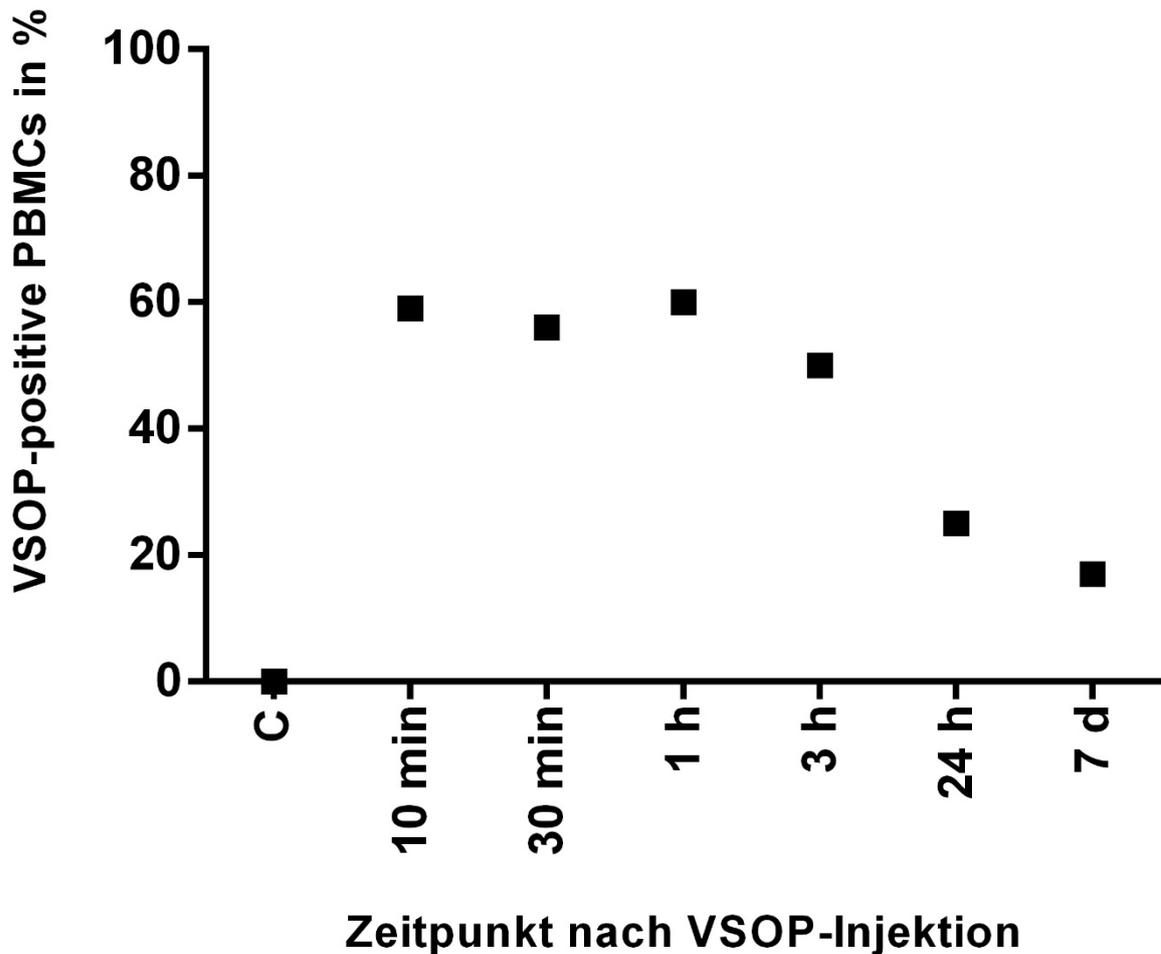
### **3.3.2 VSOP werden durch murine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aufgenommen**

Ein postulierter möglicher Mechanismus der VSOP-Aufnahme ist die Aufnahme in zirkulierende mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit anschließender Migration in atherosklerotische Plaques. Um zu untersuchen, ob PBMC VSOP aufnehmen und ob sich ggf. eine Zeitkinetik darstellen lässt, isolierten wir die PBMC aus dem Blut nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen und untersuchten diese mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

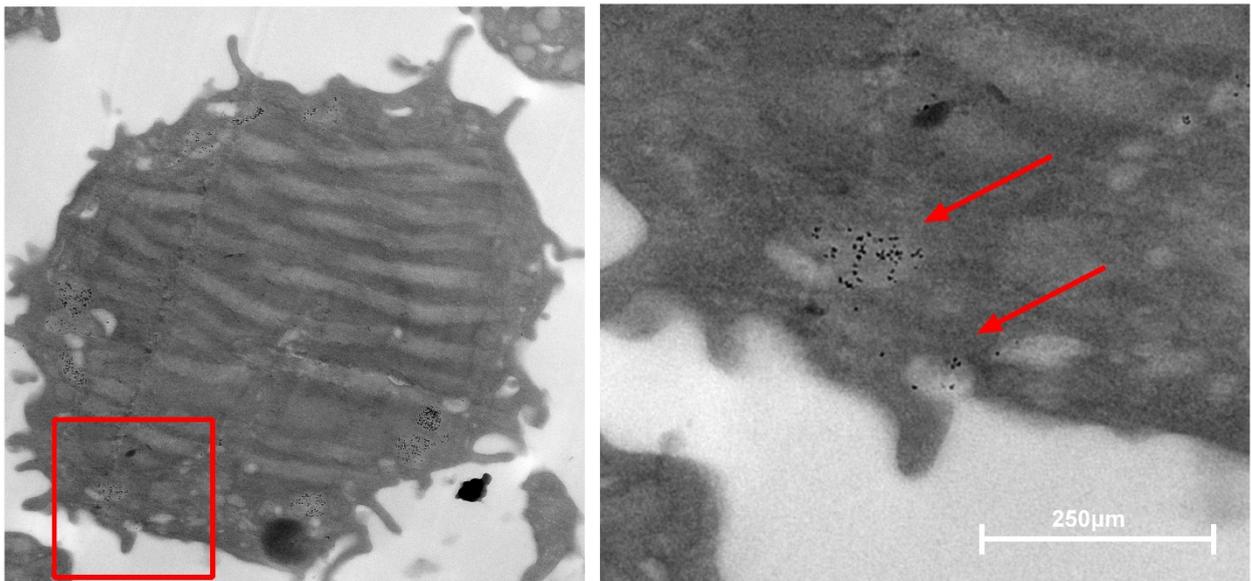
Nach Phasentrennung des durch kardiale Punktion gewonnenen Mäuseblutes mittels Lympholyte<sup>®</sup> wurden die PBMC mittels Pipette aspiriert und für die weitere Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop eingebettet. Zelluläre Verunreinigungen waren hauptsächlich durch Thrombozyten und wenige Erythrozyten bedingt, die die Auswertung der Zellen mit dem Elektronenmikroskop jedoch nicht behinderten. Nach intravenöser Injektion von VSOP mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  konnten bereits nach 5 Minuten Nanopartikel in peripheren monozytären Blutzellen intrazellulär nachgewiesen werden. 10 Minuten nach Injektion ließen sich in 59 % der transmissionselektronenmikroskopisch untersuchten PBMC Nanopartikel nachweisen. Der VSOP-positive Anteil der untersuchten PBMC betrug 56 % nach 30 Minuten und 60 % nach 1 Stunde. Ab einer Stunde ließ sich eine zunehmend geringere Anzahl partikelpositiver PBMC feststellen. 3 Stunden nach Injektion waren noch in 50 % der Zellen VSOP nachweisbar, der Anteil sank im weiteren Verlauf auf 25% nach 24 Stunden und 17 % nach 7 Tagen. In einigen Darstellungen von PBMC ließen sich zudem Prozesse darstellen, die auf eine Momentaufnahme eines Endozytoseprozesses hindeuten (s. Abb. 18).



**Abbildung 16:** Untersuchung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Transmissionselektronenmikroskopie an verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. VSOP wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen injiziert und die Versuchstiere anschließend zu angegebenen Zeitpunkten geopfert. Die Zellen wurden mittels Lympholyte®-Lösung isoliert und anschließend für die elektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitet. Dargestellt sind Zellen des Kontrolltiers ohne Injektion von Partikeln (I), sowie 5 Minuten (II), 10 Minuten (III), 30 Minuten (IV), 1 Stunde (V), 3 Stunden (VI), 24 Stunden (VII) und 7 Tage (VIII) nach Injektion. Im jeweils dazugehörigen Bildausschnitt (b) sind die Strukturen vergrößert, in denen sich VSOP erkennen lassen. Scale bars: ca. 200 nm



**Abbildung 17:** Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der in vivo-Aufnahme von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nach intravenöser Injektion in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. VSOP wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen injiziert und die Versuchstiere zu angegebenen Zeitpunkten geopfert. Anschließend erfolgte die Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil VSOP-positiver muriner PBMC an der Gesamtzahl identifizierter PBMC an verschiedenen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurde je ein Versuchstier und mindestens 100 Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. C stellt das Kontrolltier ohne Injektion von VSOP dar.

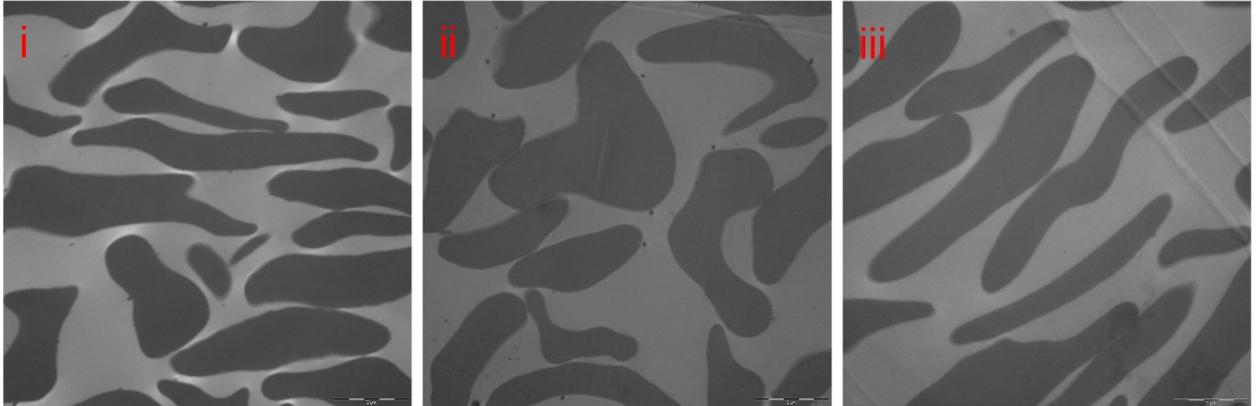


**Abbildung 18:** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung eines Endozytoseprozesses einer murinen mononukleären Zelle des peripheren Blutes (PBMC) im Rahmen der Aufnahme von very small iron oxide nanoparticles (VSOP). VSOP wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen injiziert und die Versuchstiere zu angegebenen Zeitpunkten geopfert. Anschließend erfolgte die Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Auf dem rechten Bild ist der links in Rot markierte Bildausschnitt vergrößert dargestellt. Die VSOP stellen sich als kleine schwarze Partikel dar, die sich in mehreren Vesikeln befinden. Ein zytoplasmatischer Zellausläufer ist umgibt eine kleine Partikelansammlung. Am rechten Bildrand sind kompaktere, weitere ins Zellinnere transportierte Partikel zu erkennen.

### 3.3.3 VSOP werden nicht durch murine Erythrozyten aufgenommen

In den vereinzelt mitdargestellten Thrombozyten und Erythrozyten konnten VSOP elektronenmikroskopisch weder intrazellulär noch an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Um diese Beobachtung zu validieren, führten wir weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen an Erythrozyten nach intravaskulärer VSOP-Injektion durch. Diese ließen sich analog zu den PBMC aus einer eigenen Phase des mittels Lympholyte® aufgetrennten Blutes isolieren und nach unserem Einbettungsprotokoll für die Elektronenmikroskopie aufarbeiten. Bei Erythrozyten handelt es sich um kernlose Zellen, die einer Endozytose unfähig sind.

In den untersuchten Proben ließen sich zu keinem Zeitpunkt weder an der Zelloberfläche noch intrazellulär elektronenmikroskopisch Nanopartikel nachweisen.



**Abbildung 19:** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von Erythrozyten nach Injektion von very small iron oxide nanoparticles (VSOP) in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. VSOP wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/kg/KG}$  in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen injiziert und die Versuchstiere zu angegebenen Zeitpunkten geopfert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Erythrozyten und Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Dargestellt sind Ansammlungen von Erythrozyten 5 Minuten (i), 6 Stunden (ii) und 24 Stunden (iii) nach erfolgter Injektion. Die Isolierung der Erythrozyten erfolgte nach intrakardialer Blutabnahme aus Vollblut nach Auftrennung mittels Lympholyte®. Zu keinem Zeitpunkt ließen sich in Erythrozyten VSOP elektronenmikroskopisch nachweisen. Scalebar: 2  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Synopsis der wichtigsten Ergebnisse

In unseren Versuchen in Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin konnten wir feststellen, dass die MPS eine Quantifizierung von intrazellulärem Eisen mit einer sehr hohen Sensitivität ermöglicht, ohne die Zellvitalität zu beeinflussen. Über Veränderung im  $A_5/A_3$ -Verhältnis sind außerdem Aussagen über die magnetischen Eigenschaften und die weitere Metabolisierung der untersuchten Partikel möglich. Nach Gewinnung von primären Makrophagen aus murinem Knochenmark durch Stimulation mit M-CSF stellten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied innerhalb verschiedener Makrophagenphänotypen in Bezug auf die Aufnahme von VSOP fest. Die Zugehörigkeit der Makrophagenpopulationen zum jeweiligen Phänotyp konnte zuvor eindeutig durch Bestimmung von Markergenen gesichert werden. Nach Injektion von VSOP in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen lässt sich MR-morphologisch eine Signalauslöschung in atherosklerotischen Plaques untersuchter Tiere bereits 10 Minuten nach Injektion feststellen. Eine besonders starke Signalauslöschung konnten wir in unseren Untersuchungen bildmorphologisch nach 30 Minuten feststellen. Die Signalauslöschung korreliert in den in-situ und ex-situ Aufnahmen mit den Plaquebereichen, welche sich vor allem an den klassischen Prädilektionsstellen wie der Aortenbifurkation, der inneren Kurvatur des Aortenbogens und dem Abgang des Truncus brachiocephalicus befinden. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten von isolierten murinen peripheren monozytären Zellen lassen sich bereits 10 Minuten nach intravenöser Injektion von VSOP elektronenmikroskopisch Nanopartikel nachweisen. Die durch Zählung unter dem Elektronenmikroskop bestimmte Anzahl partikelpositiver PBMC war in unserem Versuch 1 Stunde nach Injektion am höchsten, während der Anteil an nachfolgenden Zeitpunkten stetig abnahm. In Erythrozytenisolaten ließen sich elektronenmikroskopisch keine VSOP nachweisen.

## 4.2 VSOP als Cell-Tracking-Marker und Eisenquantifizierung mittels Magnetpartikelspektroskopie

Das Cell-Tracking bekommt durch die Entwicklung neuartiger Therapieansätze wie der Stammzelltherapie oder der Modifizierung von Immunzellen eine immer größere Bedeutung. Es ist daher von großem Interesse für die präklinische Entwicklung neuer Therapien, die Verteilung von injizierten Zellen im Körper des Patienten nachverfolgen zu können. Dies bietet einerseits die Möglichkeit, die Umverteilung der injizierten Zellen und deren Anreicherung in verschiedenen Kompartimenten zu untersuchen und ermöglicht außerdem Aussagen über die weitere Metabolisierung und Eliminierung. Modifizierte Zellen müssen vor Injektion detailliert charakterisiert werden, um sowohl unerwünschte Nebenwirkungen als auch ein Therapieversagen beispielsweise bei zu geringer Wirkstoffkonzentration oder fehlgeschlagener Zellmodifizierung zu vermeiden. SPIO-Partikel haben in der Vergangenheit bereits ihr Potential in der Anwendung im In-Vivo-Cell-Tracking mittels MRT-Bildgebung bewiesen. [87] Wir untersuchten nun das Potential der deutlich kleineren VSOP in der Anwendung des In-Vivo-Cell-Trackings und die mögliche Veränderung ihrer magnetischen Eigenschaften während des Aufnahmevorgangs.

Unsere Messungen zeigten, dass die Magnetpartikelspektroskopie (MPS) eine sehr genaue und zeiteffiziente Methode zur Bestimmung der magnetischen Eigenschaften und zur Quantifizierung des Partikelgehalts von VSOP-gelabelten Zellen ist. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die optimalen Messbedingungen bei einer Partikelkerngröße von etwa 30 nm erreicht werden. [104] Obwohl VSOP-Partikel mit einem Eisenkerndurchmesser von nur ca. 5 nm für die MPS-Messungen somit eher suboptimale Voraussetzungen bieten, [90] konnten wir nachweisen, dass dennoch aufgrund der hohen T1-relaxivity und dem  $r_2/r_1$ -relaxivity-Verhältnis eine sehr genaue Bestimmung des Eisengehalts möglich ist, die im Gegensatz zur Eisenquantifizierung mittels Phenanthrolin eine Beurteilung des Eisengehalts bis in den niedrigeren Nanogramm-Bereich erlaubt. Ein großer Vorteil in der Eisenquantifizierung mittels MPS im Vergleich zu anderen Methoden liegt in der Zeiteffizienz der Messung. Aufgrund der kurzen Messdauer von nur wenigen Sekunden ist durch Verkürzung der Messabstände eine sehr genaue Charakterisierung der Zellen nahezu in Echtzeit nach Applikation möglich. Wir konnten in unseren Versuchen beobachten, dass sich das  $A_5/A_3$ -Verhältnis im Laufe unserer Messungen über die Zeit ändert. Bereits innerhalb der ersten Minuten nach Kontakt der MNP mit einer THP-1-Makrophagensuspension kam es zu einer messbaren Veränderung. Bei Suspension der Partikel

in RPMI-Zellmedium mit 1%-igen FCS als Additiv ist dieser Effekt kaum zu erkennen. Eine Aggregation der Partikel z.B. an Proteine oder andere Inhaltsstoffe des Kulturmediums, mit denen die Partikel als erstes in Kontakt kommen, kann somit als ursächlicher Faktor weitestgehend ausgeschlossen werden. [99] Diese Beobachtung lässt eine Veränderung des magnetischen Verhaltens der Partikel durch eine Interaktion mit Zelloberflächenmolekülen der THP-1 Monozyten und –Makrophagen vermuten. An der Außenseite jeder eukaryotischen Zelle findet sich eine Vielzahl von Glykoproteinen mit gebundenen Polysacchariden, die in ihrer Gesamtheit als Glykokalyx bezeichnet werden. Die Polysaccharidketten bestehen aus einer Kombination von Chondroitin-, Heparan-, Dermatan- und Keratansulfaten und besitzen durch ihre Sulfat- und Uronsäureketten eine negative Oberflächenladung. Die Arbeitsgruppe um Berndt et. al konnte anhand eines Mausmodells der induzierten autoimmunen Enzephalomyelitis beobachten, dass VSOP an entzündlich veränderte Endothelzellen, nicht jedoch an gesundes Endothel binden. Diese Beobachtung erklärten sie mit einer veränderten Glykosaminoglykanausstattung der Glykokalyx im Rahmen der entzündlichen Reaktion. Eine enzymatische Degradation der Glykosaminoglykane von Endothelzellen der Tumorzelllinie bEnd.3 in vitro führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der VSOP-Aufnahme. [105] Da sowohl VSOP als auch die Polysaccharidketten der Zelloberfläche eine negative Oberflächenladung besitzen, widerspricht eine direkte Interaktion jedoch den physikalischen Prinzipien. Wir vermuten für VSOP einen Verlust der Citrat-Beschichtung im Rahmen des Kontakts mit der Zelloberfläche von Makrophagen und Monozyten. Dieser Effekt wird als Trans-Chelierung bezeichnet und ist bereits für gadoliniumhaltige Kontrastmittel in Verbindung mit Heparansulfaten beobachtet worden. [106] Durch den Verlust dieser Beschichtung konzentrieren sich die Partikel an Proteinen der Glykokalyx und bilden Aggregate. Sowohl durch Summationseffekte der zusammengelagerten Nanopartikel als auch durch Verlust der ursprünglichen Beschichtung ändern sich die magnetischen Eigenschaften der Partikel, was durch ein in unseren Versuchen verändertes  $A_5/A_3$ -Verhältnis messbar war. Nach Internalisierung der Partikel werden diese in Phagolysosomen transportiert. Durch die dortige zunehmende Desintegration der Partikel, die sich elektronenmikroskopisch in einer zunehmend dichteren Akkumulation in Vesikeln äußert, verlieren diese ihre ursprüngliche Struktur. Dies geht mit einer weiteren steten Abnahme des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses einher.

Nach Transport der Zellen zur Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin und wiederholten Messungen ließ sich keine negative Auswirkung auf die Vitalität der Zellen beobachten. Dies ist ein besonders hervorzuhebender Vorteil gegenüber anderen Messmethoden zur Charakterisierung

und Quantifizierung des Eisengehalts von Nanopartikeln und ist eine Voraussetzung zur Verwendung dieser Methode im Rahmen des In-Vivo-Cell-Trackings. Andere Methoden wie beispielsweise die photometrische Eisenquantifizierung mittels Phenanthrolin-Assay bedingen eine Lyse der Zellen und damit einen Verlust der Zellvitalität. Interessanterweise ergab in denselben Proben der mittels MPS kalkulierte Eisengehalt pro Zelle höhere Werte als in photometrischen Messungen mit Phenanthrolin. Da im Rahmen der Eisenquantifizierung mittels Phenanthrolin die Zellen durch Salzsäure lysiert werden und somit jegliches intrazelluläre Eisen gemessen wird, wohingegen die MPS-Messung nur ferromagnetisches Eisen erfasst, wäre hier eine umgekehrte Beobachtung zu erwarten gewesen. In weiteren hier nicht gezeigten Untersuchungen gelang es jedoch in Zusammenarbeit mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt eine Korrekturformel zu entwickeln, die eine sehr genaue Korrelation der beiden Messmethoden erlaubte. [99]

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass im Vergleich zu anderen Methoden mittels MPS-Messung nicht nur eine sehr zeiteffiziente und genaue Bestimmung des intrazellulären Eisengehalts unter in-vivo-Bedingungen möglich ist, sondern dass über die Bestimmung des A5/A3-Verhältnisses zusätzliche Aussagen über die Prozessierung und eine damit einhergehende Veränderung der magnetischen Eigenschaften der Eisenpartikel getroffen werden können.

### **4.3 Einfluss des Polarisationsstatus von Makrophagen auf die Aufnahme von VSOP und möglicher Aufnahmemechanismus**

In unseren Zellkulturuntersuchungen mit primären, aus Knochenmark gewonnenen Makrophagen konnten wir keine statistisch signifikanten Unterschiede in der quantitativen Aufnahme von elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln innerhalb der mit den pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen IFN- $\gamma$  und IL-4 behandelten Zellpopulationen beobachten. Allein in proteinarmer Lösung zeigte sich 6 Stunden nach Behandlung der Zellen mit VSOP ein statistisch signifikant erhöhter Eisengehalt in der Kontrollgruppe im Vergleich zur M1- und M2-Population. Diesen lediglich an einem Zeitpunkt messbaren Unterschied schrieben wir am ehesten einem ungehinderten Metabolismus im optimalen Zellkulturmilieu ohne Stimulationsreiz durch Zytokine zu. Die Aufnahme von VSOP war in proteinarmer Lösung (1 % FCS) in unseren Versuchen um den Faktor 5,8 höher als in proteinreicher Lösung (10 % FCS).

Die Polarisation von primären Makrophagen in den inflammatorischen M1- und antiinflammatorischen M2-Phänotyp verändert die Expression von verschiedenen Genen und ihren Proteinen, denen eine mögliche Rolle in der Aufnahme von MNP zugeschrieben wird. Satomi et al. konnten 2013 beobachten, dass die Aufnahme von „Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles (USPIO) im M1-Phänotyp im Vergleich zum M2-Phänotyp signifikant erhöht war. Die Arbeitsgruppe nutzte jedoch USPIO-Partikel für ihre Analysen, die einen deutlich größeren Partikeldurchmesser als VSOP aufweisen und somit möglicherweise durch einen anderen Aufnahmemechanismus internalisiert werden. Zusätzlich wurden die Versuche nicht mit primären, aus Knochenmarkzellen differenzierten Makrophagen, sondern an der THP-1-Tumorzelllinie und die Stimulation der Makrophagen mit einem leicht veränderten Protokoll durchgeführt. Die Unterschiede in der USPIO-Aufnahme führten sie auf eine veränderte Expression von Genen des Eisenstoffwechsels zurück. [107] Rogers et. al. beobachteten 2005 in Versuchen mit polarisierten murinen Makrophagen eine deutlich erhöhte Aufnahme von Dextran-beschichteten superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPIO) sowohl in der M1- als auch in der M2-Population im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Zellen, die in proteinfreiem Serum gehalten wurden, fiel die Aufnahme von SPIO um 57 % geringer aus. [108] Moore et. al. beschrieben 1997 in Versuchen mit „Monocrystalline iron oxide nanoparticles“ („MION“) einen ähnlichen Effekt. Sie beobachteten eine 6-fach erhöhte Aufnahme von murinen peritonealen Makrophagen nach Opsonierung mit Fibronectin und Vitronectin im Vergleich zu nicht-opsonierten Partikeln. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Zugabe von Dextran als kompetitiver Inhibitor einer Dextranrezeptor-vermittelten Endozytose, die Aufnahme der Nanopartikel nicht beeinflusst wurde und somit eine Rolle des Dextranrezeptors in der Aufnahme unwahrscheinlich erscheint. In weiteren Experimenten beobachteten sie eine 72 %-ige Reduktion der MION-Aufnahme durch N-Ethylmaleinimid, ein Stoff, der eine Blockierung von Sulfhydrylgruppen und damit eine Inhibition der Membranfusion bei zellulären Transportmechanismen bewirkt. Sie schlussfolgerten daher einen Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismus z.B. über auf der Makrophagenmembran befindliche Scavenger- oder Komplementrezeptoren. Dass Scavenger-Rezeptoren an der Aufnahme Dextran-beschichteter Partikel beteiligt sind, vermutete auch die Arbeitsgruppe um Raynal et. al 2004, die beobachteten, dass die Aufnahme von Ferumoxtran-10 (Hydrodynamischer Durchmesser 22 nm) und Ferumoxid (Kerndurchmesser: 150 nm) in primären murinen Makrophagen durch die Scavenger-Rezeptor-A-Liganden Fucoidan und Polyinosinmonophosphat gehemmt wird. Diese Beobachtungen stehen in Kontrast zu unseren Versuchsergebnissen. Im Gegensatz zu einer möglichen Aufnahme von VSOP durch Scavenger- oder Dextranrezeptoren vermuten wir einen

Einfluss von Glykosaminoglykanen in der Aufnahme der MNP. Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass VSOP von THP-1 Monozyten und Makrophagen effizient aufgenommen werden. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe führte eine Inhibierung der Glykosaminoglykansynthese von THP-1-Makrophagen durch Glukoseentzug zu einer statistisch signifikant verminderten Bindung von VSOP an die Zellmembran. [79] Die Arbeitsgruppe um Ambrosius konnte 2008 zeigen, dass die THP-1-Tumorzelllinie mit einem Anteil von 93,3 % am gesamten Gehalt sulfatierter Glykosaminoglykan-Disacharide einer Zelle fast ausschließlich Chondroitin-4-sulfate enthält. Zu vernachlässigen sind hierbei die Heparansulfate, die lediglich einen Anteil von ca. 7 % darstellen. Wir vermuten somit eine Aufnahme der Partikel, die insbesondere durch Chondroitinsulfat-haltige Glykosaminoglykane vermittelt wird. [109] Makatsori et. al beschrieben bei humanen THP-1-Monozyten eine Expression auf mRNA-Ebene von sechs Zellmembran-assoziierten Proteoglykanen: Syndecan-1, -2 und -4, Glypican-1, Thrombomodulin (alle Heparansulfat-Proteoglykane) und CD 44. Ebenso konnte mRNA, die für die Proteoglykane Versican und Perlecan kodiert, gefunden werden. [110] Insbesondere Proteoglykanen wie z.B. Versican, einem Chondroitinsulfatproteoglykan, ist eine mögliche Rolle in der Aufnahme der Nanopartikel zuzuschreiben. In zuvor publizierten Daten wurde beispielsweise eine um den Faktor 16 stärkere Expression von Versican im M1-Phänotyp in polarisierten humanen Makrophagen beschrieben. Etliche weitere Membranrezeptoren wie der Macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), der eine mögliche Rolle in der Aufnahme von VSOP spielen könnte sowie Gene des Eisenstoffwechsels, zeigen eine unterschiedliche Expression innerhalb des M1- und M2-Phänotyps. [103]. Somit wurde bei einer ebenfalls entsprechend stark veränderten Genexpression im Mausmodell eine unterschiedliche Aufnahme von VSOP in Makrophagen des M1- und M2-Phänotyps angenommen. In unseren Versuchen mit murinen primären Makrophagen konnten wir diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Rogers et al., der die Aufnahme von SPIO-Partikeln untersuchte, war die Aufnahme von VSOP in proteinarmer Lösung in unseren Versuchen erhöht, nicht erniedrigt. Rogers et al. erklärten eine stärkere Aufnahme der MNP durch einen höheren Serumproteingehalt des Kulturmediums mit einer stärkeren Opsonierung der Nanopartikel durch Proteine des Komplementsystems und Immunglobuline. Wir schließen damit eine Opsonierung von VSOP als notwendigen Schritt in der Aufnahme der Nanopartikel aus. Eine Eingrenzung auf ein für die Partikelaufnahme verantwortliches Rezeptormolekül ist anhand der Versuchsergebnisse mit polarisierten murinen Makrophagen nicht möglich.

#### **4.4 Aufnahme von VSOP in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und atherosklerotische Plaques sowie Rückschlüsse auf einen möglichen Aufnahmemechanismus**

Um den für die Aufnahme von VSOP verantwortlichen Mechanismus weiter eingrenzen zu können, führten wir Untersuchungen an murinen PBMC nach intravenöser Injektion von VSOP durch. Außerdem untersuchten wir an einem Mausmodell, zu welchem Zeitpunkt sich ein Korrelat zur VSOP-Aufnahme in der Magnetresonanztomographie darstellen lässt.

Bereits 10 Minuten nach Injektion ließen sich in 59 % aller untersuchten mononukleären Zellen des peripheren Blutes elektronenmikroskopisch VSOP nachweisen. Auch wenn der Anteil an VSOP-positiven PBMC mit der Zeit stetig abfiel, waren noch 7 Tage nach Injektion der MNP diese in 17 % der untersuchten PBMC nachweisbar. Auch in der Magnetresonanztomographie führte die Anreicherung von VSOP zu einem negativen Kontrast in atherosklerotischen Plaques typischer Prädispositionsstellen bereits 10 Minuten nach Injektion, mit einem Signalmaximum 3 Stunden nach Injektion.

Am Watanabe-Kaninchenmodell wurde in der Bildgebung mittels Kleintier-MRT eine Signalauslöschung im Bereich atherosklerotischer Plaques 1 Stunde nach intravenöser Gabe von VSOP festgestellt. Die Stärke des Signalverlusts korrelierte mit dem Progress atherosklerotischer Läsionen und war bei fortgeschrittenen, komplizierten Läsionen (siehe auch Abb. 1) am größten. Histopathologisch bestand ein Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte der Plaques und der Stärke des Signals. USPIO ließen sich in Endothelzellen und Makrophagen aortaler Plaques nachweisen. [85] Eine in-vitro Studie von 2013 verglich die Aufnahme von VSOP und Resovist® in THP-1-Monozyten, THP-1-Makrophagen sowie primären Makrophagen. Es konnte eine deutlich schnellere und stärkere Aufnahme von VSOP in allen Zelltypen beobachtet werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten VSOP im Gegensatz zu Resovist® nicht nur eine Anreicherung in intrazellulären Vesikeln, sondern auch an der Zelloberfläche. In Einklang mit zuvor publizierten Beobachtungen mit Gold-Nanopartikeln wurde die Hypothese formuliert, dass durch die Anheftung von VSOP an der Zelloberfläche eine Hochregulierung der Phagozytose induziert wird. [79, 111] Während eine Eliminierung von Eisenoxidnanopartikeln über phagozytierende Zellen des retikulohistiozytären Systems als sicher gilt, sind die verantwortlichen Aufnahmemechanismen weitestgehend nicht untersucht. Für SPIO und USPIO wird eine tragende Rolle von Makrophagen für die Partikelaufnahme in atherosklerotische

Plaques vermutet. [74, 75, 85] Ob Eisenoxidpartikel bereits durch zirkulierende Phagozyten aufgenommen werden und anschließend via Transzytose, Neovaskularisation oder lecke Interzellularkontakte in die Plaqueregion migrieren oder die Partikel erst in der Plaqueregion phagozytiert werden, bleibt bisher ungeklärt. [74] Aufgrund der bereits beschriebenen Beobachtungen einer deutlich schnelleren und effizienten Aufnahme von VSOP-Partikeln in atherosklerotische Plaques sowie phagozytierende Zellen wird für VSOP ein bisher unbekannter, weiterer Aufnahmemechanismus angenommen. Makowski et. al sahen 2011 in Untersuchungen am Mausmodell eine Anreicherung von VSOP in Plaques der Arteria brachiocephalicus 24 Stunden nach intravenöser Injektion. Die Nanopartikel konnten in Makrophagen atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden. Als möglichen Aufnahmemechanismus formulierten sie die Rekrutierung von zirkulierenden peripheren Monozyten mit anschließender Migration in die Schulterregion der Plaques. Alternativ könnten VSOP die Plaques auch wie bereits für SPIO und USPIO vermutet durch erhöhte endotheliale Permeabilität oder durch Neovaskularisation der Plaqueregion erreichen und anschließend von Makrophagen phagozytiert werden. [94] Wagner et. al sahen 2013 nach in-vivo Untersuchungen an Watanabe-Kaninchen neben Makrophagen der Plaqueregion kalzifizierende Mikrovesikel mit hohem Gehalt an mehrfach sulfatierten Gylkosaminoglykanen als mögliche Zielstrukturen von VSOP. [93] Unsere Arbeitsgruppe konnte in eigenen in-vitro-Untersuchungen zeigen, dass VSOP mit hoher Affinität an Glykosaminoglykane der Zelloberfläche binden. [79] Somit nehmen möglicherweise auch insbesondere sulfatierte Glykosaminoglykane eine tragende Rolle in der Aufnahme von VSOP in atheroskleroseassoziierte Zelltypen ein.

Wie in der Fragestellung dieser Arbeit bereits formuliert, sind für die Anreicherung von VSOP in atherosklerotische Läsionen folgende Erklärungsansätze denkbar:

1. Bindung/Aufnahme in extrazelluläre Vesikel („Matrixvesikel“, „Ektosomen“, etc.) mit anschließender Migration in atherosklerotische Plaques
2. Aufnahme in zirkulierende mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und anschließende Migration in atherosklerotische Plaques
3. Passive Diffusion der VSOP durch die Zellmembran, ggf. verstärkt durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität oder passive Diffusion durch pathologisch durchlässigere tight junctions
4. Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport mit Migration der VSOP in Plaques durch Vasa Vasorum

## 5. Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport der Partikel mit anschließender Aufnahme über Endozytose

Vergleicht man das Aufnahmeverhalten und die biochemischen Eigenschaften verschiedener Polymer-beschichteter Eisenpartikel, zeigen VSOP eine bis zu dreifach stärkere Akkumulation in atherosklerotischen Plaques als Nanopartikel mit anderer Oberflächenbeschichtung. VSOP besitzen im Partikelvergleich mit 38,5 Minuten bzw. 27,32 Minuten (invasiv mittels MPS-Messung/nichtinvasiv über UTE Sequenz MR-morphologisch) die zweithöchste Halbwertszeit und damit verbunden eine längere Zirkulationsdauer, was die verstärkte Anreicherung zumindest teilweise, da Etidronsäurepartikel bei längster Halbwertszeit eine schwächere Anreicherung zeigen, jedoch nicht vollständig erklärt. [112] Die längere Halbwertszeit erklärt sich durch die vergleichsweise kleine Größe der Partikel, die negative Oberflächenladung und den hydrophilen Charakter der Citratketten, für die eine geringere Opsonierung der Partikel und damit geringere Eliminierung über das RES beschrieben wurde. [113, 114] Ist die Konzentration an Nanopartikeln im Gefäßsystem hoch, zum Beispiel wenige Minuten nach Injektion, kann der negative Kontrast für Gefäßdarstellungen genutzt und so beispielsweise stenotische Gefäßabschnitte diagnostiziert werden. Sobald die Konzentration ausreichend abgesunken ist, ist eine Darstellung der in Plaques angereicherten Nanopartikel möglich, sodass nun auch nicht-stenotische Plaques erkannt werden.

Theorie 1: VSOP binden an extrazelluläre Vesikel (Matrixvesikel, Ektosomen) mit anschließender Migration in atherosklerotische Plaques.

In Untersuchungen von Wagner et. al 2013 wurde die Aufnahme von VSOP im Tierversuch mit Watanabe hyperlipidämischen Kaninchen in atherosklerotische Plaques untersucht. Im Rahmen der Arbeit wurden kalzifizierte Mikrovesikel mit hohem Glykosaminoglykangehalt und Makrophagen als Zielstrukturen formuliert. Es wird angenommen, dass die Citrathülle der Nanopartikel bei der Interaktion mit den Glykosaminoglykanen aufgrund ihres großen Potenzials komplexierende Verbindungen einzugehen, verloren geht. [93] In nachfolgenden Untersuchungen ist die Aufnahme von VSOP in sog. Matrixvesikel jedoch angezweifelt worden, nachdem in Preußisch-Blau-Färbungen von Kontrolltieren ebenfalls blaugefärbte Bereiche sichtbar waren, bei denen es sich um endogenes Eisen handelte, sodass die Rolle von Matrixvesikeln unklar bleibt. [93] Jedoch konnten auch wir in eigenen Untersuchungen mit THP-1-Makrophagen eine hohe Affinität von VSOP an Strukturen beobachten, die wir als „apoptotic bodies“ bezeichneten. [79] Sogenannten „Exosomen“ oder „Mikrovesikeln“ wird eine

zunehmend größere Rolle in der Beteiligung an verschiedensten pathologischen Prozessen wie der Krebsentstehung, aber auch der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, zuteil. Zu den Inhalten extrazellulärer Vesikel zählen neben Nukleinsäuren auch verschiedene Lipide und Proteine, sodass nicht auszuschließen ist, dass diese Zielstrukturen von MNP darstellen. [115] Da wir in unseren Versuchen eine zügige Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques ohne die Anwesenheit von Matrixvesikeln zeigen konnten, können wir weitestgehend ausschließen, dass die Aufnahme über Matrixvesikel vermittelt wird.

Theorie 2: VSOP werden von zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) phagozytiert und diese migrieren anschließend in atherosklerotische Plaques.

Die Ergebnisse der laborexperimentellen Untersuchungen konnten zeigen, dass sich VSOP im Mausmodell der Atherosklerose bereits innerhalb von 10 Minuten sowohl in peripheren monozytären Zellen als auch in atherosklerotischen Plaques anreichern. Diese Aufnahme ist quantitativ ausreichend, um ein als Signalauslöschung sichtbares bildmorphologisches Korrelat im MRT zu erzeugen. PBMC-assoziierte VSOP waren hauptsächlich in Vesikeln mit einem Durchmesser von 100–250 nm lokalisiert, die jeweils Hunderte von VSOP beinhalten. In 59 % der ausgezählten PBMC konnten wir VSOP in großer Menge bereits 10 Minuten nach intravenöser Injektion nachweisen. Durch die sehr schnelle Anreicherung und den simultanen Nachweis einer Signalauslöschung als Korrelat der Aufnahme in atherosklerotische Plaques nach 10 Minuten schließen wir aus, dass primär eine Aufnahme und Transport der Partikel durch periphere Zellen zu den Plaqueregionen für die Anreicherung verantwortlich ist. Eine Migration der monozytären Zellen in Plaqueregionen innerhalb von wenigen Minuten in einer so hohen Anzahl, als dass dieser Aufnahmeweg alleine für die Detektion des negativen Kontrasts in den Plaqueregionen verantwortlich wäre, erscheint nicht plausibel. Da VSOP in zirkulierenden PBMC bis 7 Tagen nach Injektion nachgewiesen werden können, kann der zelluläre Transport der Partikel durch zirkulierende Zellen mit anschließender Zellmigration ebenfalls zu einer langsamen, aber steten Anreicherung von Plaques mit VSOP beitragen, auch wenn wir in unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt eine Migration von PBMC in die Plaqueregion nachweisen konnten. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Swirski et. al. Sie konnten mit Hilfe von mit <sup>111</sup>Inoxin markierten und transgenetisch modifizierten murinen Monozyten des peripheren Blutes zeigen, dass diese sich in atherosklerotischen Plaques anreichern und die Anreicherung mit der Größe der Plaqueregion korrelierte. Die Halbwertszeit

der Monozyten betrug  $43,5 \pm 7,9$  Stunden und bestätigt somit ebenfalls, dass PMCS nicht für die bereits nach 10 Minuten nachweisbare Signalauslöschung verantwortlich sein können. [116]

Theorie 3: VSOP diffundieren passiv durch die Zellmembran, ggf. verstärkt durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität oder pathologisch durchlässigere tight junctions.

Bei sehr kleinen Partikeln im niedrigen zweistelligen Nanometer-Bereich und kleiner, zu denen auch VSOP zählen, sind passive Aufnahmen über die Zellmembran beschrieben worden. [117] In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen Erythrozyten als Verunreinigungen der PBMC-Extraktion keine VSOP-Anreicherung. Ebenso lassen sich keine VSOP in eigens für die Elektronenmikroskopie aufgearbeiteten Erythrozytenisolaten nachweisen. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und ein dichtes Spectrin-Actin-Membranskelett, sodass es bis auf wenige Ausnahmen und Sonderfälle (neonatale Erythrozyten, mit Plasmodien infizierte Erythrozyten) generell akzeptiert ist, dass diese einen aktiven Transportmechanismus wie Endozytose nicht fähig sind. [118] Sie sind damit ein geeignetes Modell um zu überprüfen, ob Stoffe über einen passiven, transmembranären Transport in die Zelle gelangen können. Da wir in unseren Versuchen trotz der vergleichsweise kleinen Partikelgröße von VSOP keine Aufnahme in Erythrozyten beobachten konnten, schließen wir einen für die Partikel Aufnahme verantwortlichen passiven Aufnahmemechanismus aus (s. Abb. 19).

Theorie 4: Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport mit Migration der VSOP in Plaques durch Vasa Vasorum

Für Gadofluorin, ein neueres makrozyklisches Gadolinium-haltiges Kontrastmittel, ist nicht nur eine Kollokalisierung mit lipidbeladenen Makrophagen, sondern auch eine vermehrte Anreicherung in Plaqueregionen mit einer ausgeprägte Neovaskularisierung beschrieben worden. Dies resultierte insbesondere in einer Kontrastanreicherung in tieferen Plauebereichen [119] und könnte so auf einen Zusammenhang zwischen Neovaskularisierung von Plaques und Anreicherung von Kontrastmittel schließen lassen. Da sich die durch MNP verursachte Signalauslöschung in unseren Versuchen im gesamten Plauebereich zeigte und sich nicht auf neovaskularisierte Regionen beschränkte, scheint dies als Hauptmechanismus der Anreicherung unwahrscheinlich.

Theorie 5: Freie Zirkulation bzw. proteingebundener Transport der Partikel mit anschließender Aufnahme über Endozytose

In einigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung Nr. 16) lassen sich Zellausläufer von PBMC zeigen, die eine aktive Aufnahme der Nanopartikel über einen Endozytoseprozess suggerieren. Auch das Vorhandensein von VSOP in vesikelähnlichen Strukturen im Zellinneren von PBMC unterstützt diese These. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir eine Stunde nach Injektion von VSOP in die Schwanzvene von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen Aggregate von Nanopartikeln an der Oberfläche und in lumennahen Vesikeln von plaquebedeckenden Endothelzellen der Aorta ascendens nachweisen. Es lassen sich zudem in mehreren Aufnahmen Invaginationen der Zellmembran von Endothelzellen als Momentaufnahme einer Partikelaufnahme beobachten. [97] Da die Nanopartikel bis in tiefer gelegene Plaquebereiche gelangen, handelt es sich hierbei um eine Transzytose. Es konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Aufnahme von VSOP in an Plaquebereiche angrenzende Endothelzellen verstärkt auftritt. [97] Auch Kooi et. al beschrieb 2003 die Transzytose als wahrscheinlich verantwortlichen Aufnahmemechanismus für USPIO. Entzündliche Prozesse während der Plaqueprogression führen zu einer gesteigerten Permeabilität des Endothels. Dies geschieht einerseits durch eine Lockerung von Zell-Zell- (tight junctions) und Zell-Matrix-Kontakten, andererseits scheint der inflammatorische Reiz auch aktive Aufnahmeprozesse zu stimulieren. [120] Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, dass möglicherweise Glykosaminoglykane die Aufnahme von VSOP vermitteln. Matrixvesikel, die mögliche Zielstrukturen von VSOP darstellen, wiesen einen hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen auf. [93] Ebenso konnten wir bereits demonstrieren, dass VSOP mit hoher Affinität an Glykosaminoglykane der Zelloberfläche binden. Eine Inhibierung der Glykosaminoglykansynthese von THP-1-Makrophagen durch Glukoseentzug führte zu einer statistisch signifikant verminderten Bindung von VSOP an die Zellmembran. [79] Daher fokussierten wir uns auf die Identifikation eines möglichen durch Glykosaminoglykane vermittelten aktiven Transportmechanismus. Grob unterschieden werden Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Aufnahmemechanismen. Eine Heparansulfat-Proteoglykan-vermittelte Endozytose für Peptide, Polykation-DNA-Komplexe, Viren, Lipoproteine, Wachstumsfaktoren und andere Liganden ist bereits beschrieben worden. Welcher Aufnahmemechanismus nach Mediation durch Glykosaminoglykane abläuft, ist jedoch weitestgehend unerforscht und scheint teilweise auch vom Liganden abhängig zu sein. [121, 122] In weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe an „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) konnte eine Inhibierung der VSOP-Aufnahme durch Zugabe von Dynasore erreicht werden. Dynasore ist ein spezifischer Inhibitor der GTPase Dynamine, die für die Abspaltung von Vesikeln der Plasmamembran in Clathrin- und Caveolin-abhängigen Endozytoseprozessen essentiell ist. Auch eine Hemmung von

Caveolin-1 (CAV-1) sowie des „clathrin heavy chain protein“ („CLT“) durch SiRNA resultierte in einer verminderten VSOP-Aufnahme. Daraus schlussfolgern wir, dass nach Bindung von VSOP an GAG-Komplexe der Zellmembran Dynamin-abhängige Endozytoseprozesse ablaufen, sowohl über Caveolin- als auch über Clathrin-abhängige Transportwege. [97] Wie die Bindung der MNP an die Glykokalyx einer Zelle und die nachfolgende Endozytose miteinander verknüpft sind, ist weitestgehend unbekannt. Ein möglicher vermittelnder Rezeptor ist CD 44, ein Zellmembranrezeptor, der auch in THP-1-Zellen zu finden ist und von dem verschiedene Isoformen mit unterschiedlichem Bindungsverhalten existieren, die unter anderem auch Heparansulfatketten besitzen. [110] Bekannte Funktionen von CD 44 sind die Bindung von Hyaluronsäure, Osteopontin, Kollagenen und Matrix-Metalloproteinasen sowie die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten. [123] In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch Chondroitinsulfatproteoglykane wie Aggrecan und auch Versican potenzielle Rezeptorliganden darstellen und dass die Kopplung von Chondroitinsulfaten an Liganden die CD 44-vermittelte Endozytose verstärken kann. [124-126] Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ist zumindest für Hyaluronsäure ein Clathrin-, Caveolin- und Makropinozytose-unabhängiger CD 44-assoziiertes Aufnahmemechanismus beschrieben worden. [127] Außerdem scheint CD 44 zusätzlich als primärer Rezeptor für die Phagozytose von größeren Partikeln ( $>3 \mu\text{m}$ ) wie Zelldebris oder apoptotischem Material zu fungieren. [128] Es werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig sein, um festzustellen, ob CD 44 tatsächlich ein für die VSOP-Aufnahme wichtiger Membranrezeptor ist.

#### 4.5 Fehlerquellen und Schwierigkeiten

Da es sich bei in-vivo Versuchen um Experimente mit verschiedenen Individuen handelt, ist eine Varianz der Versuchstiere trotz sorgfältiger Auswahl nicht zu vermeiden. Aus diesem Grund kommt es in unseren Versuchen zu einer hohen Standardabweichung der Ergebnisse, die eine sehr hohe Versuchszahl und damit einhergehende verbesserte statistische Power notwendig machen würde, um die Effekte zu minimieren. Erschwert wird dies in unseren Versuchsreihen zusätzlich durch die Tatsache, dass nicht alle Polarisierungen trotz identischem Ablauf erfolgreich verliefen und somit einige Versuchsreihen verworfen werden mussten. Es scheint zudem eine unspezifische Affinität der VSOP zur Oberfläche der Zellkulturschalen zu geben, sodass Veränderungen des Eisengehalts innerhalb der verschiedenen Populationen bei sehr kleiner Differenz unentdeckt bleiben könnten, auch wenn es sich hierbei um einen systematischen Fehler

handeln würde. Während der Arbeit mit primären Zellkulturen kann es trotz sorgfältiger Durchführung zu bakterieller Kontamination kommen. In unseren Versuchen war dies bei einer von 13 Präparationen der Fall (dies entspricht einer Kontamination von 7,7 % aller Zellkulturen). Ein großer Anteil von Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark konnte durch die Stimulation mit M-CSF zu primären Makrophagen differenziert werden. Da es sich um teilungsunfähige Zellen handelt, ist die Zahl der zu gewinnenden Zellen jedoch begrenzt und es gab zeitweise Schwierigkeiten, ausreichend genetisches Material zur Überprüfung der Polarisierung zu erhalten. Im Rahmen der Probenvorbereitung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen kam es zu einer inkonsistenten Qualität der angefertigten Ultradünnschnitte. Auch durch testweise Abänderung verschiedener Schritte des Einbettungsprotokolls konnte keine deutliche Besserung erreicht werden. Trotz dieser Qualitätsunterschiede war aufgrund der Vielzahl angefertigter Schnitte eine Auszählung von 100 PBMC pro Zeitpunkt möglich. Die ursächliche Fehlerquelle konnte jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Durch die Färbung des Zellmaterials mit Osmiumtetroxid kam es teilweise zu kleineren Ablagerungen von Farbrückständen, die bei Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop eine Ähnlichkeit mit MNP aufwiesen. Durch stärkere Vergrößerung war es jedoch möglich, die Partikel als MNP oder Osmiumtetroxidrückstände zu identifizieren.

#### **4.6 Schlussfolgerungen**

Die Magnetpartikelspektroskopie erlaubt nicht nur eine Quantifizierung der Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln mit hoher Sensitivität und Spezifität bis in den niedrigen Nanogramm-Bereich, sondern kann über messbare Veränderungen des  $A_5/A_3$ -Verhältnisses ebenfalls Aussagen über Veränderungen der magnetischen Eigenschaften während Aufnahme und Prozessierung der Partikel treffen. Unsere Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass sich VSOP sehr gut eignen, um atherosklerotische Plaques in der MRT-Bildgebung zu visualisieren. Durch die im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Nanopartikeln deutlich schnellere Aufnahme besitzen VSOP einen großen Vorteil in Hinsicht auf die klinische Anwendbarkeit. Zusätzlich ist es durch die hohe Blutkonzentration von MNP nach Injektion möglich, diese als Kontrastmittel für eine MR-Angiographie mit Darstellung stenotischer Gefäßabschnitte zu nutzen, was ihren klinischen Nutzen erhöht. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir zudem den verantwortlichen Aufnahmemechanismus von VSOP stark eingrenzen. Ergebnisse der MPS-Messungen deuten auf eine schnelle Interaktion der VSOP

mit Zelloberflächenmolekülen hin. Als mutmaßliche Bindungsstelle der VSOP an der Zelloberfläche fungieren Glykosaminoglykanketten, wobei insbesondere der Grad der Sulfatierung einen Einfluss auf die Internalisierung der Nanopartikel zu haben scheint. Bei der nach Bindung der MNP an die Glykokalyx initiierten Aufnahme der Partikel handelt es sich um einen Endozytoseprozess, also einen aktiven Aufnahmemechanismus. Zellausläufer und die Bildung von Vesikeln konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt werden und eine passive Aufnahme der Partikel über die Zellmembran wurde ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten eine Dynamin-abhängige Transzytose als verantwortlichen Mechanismus identifizieren. [97] Da sich Partikel-enthaltende PBMC auch noch eine Woche nach Injektion nachweisen lassen, kann zu einem geringeren Anteil auch die Migration von PBMC in die Plaqueregion für die Anreicherung der MNP in atherosklerotische Plaques verantwortlich sein. Auch eine geringe Anreicherung durch Zirkulation von MNP über die Neovaskularisation der Plaques ist nicht auszuschließen, dürfte jedoch wie auch die Migration von PBMC wenn überhaupt nur geringfügig für die MNP-Aufnahme verantwortlich sein. Die nach Bindung der MNP an die Zelloberfläche ablaufende Signalkaskade ist weiterhin nicht eindeutig identifiziert. Mögliche Faktoren, die die Endozytose vermitteln, sind CD 44 und Proteoglykane wie Versican. Während wir eine zügige Aufnahme von MNP in Makrophagen und Monozyten beobachten konnten, war eine selektive oder stärkere Aufnahme von MNP in einen der verschiedenen Makrophagenphänotypen nicht festzustellen. Für den klinischen Kontext bedeutet dies, dass VSOP nicht geeignet sind, um Plaques nach Anteil der M1- oder M2-Makrophagen zu charakterisieren, jedoch sowohl Makrophagen, unabhängig ihres Phänotyps, als auch Monozyten Zielstrukturen von VSOP darstellen.

#### **4.7 Ausblick**

In den letzten Jahren haben sich individualisierte Therapien mit genetisch modifizierten Zellen stark weiterentwickelt. VSOP sind sehr gut geeignet, diese Zellen in der präklinischen Entwicklung zu markieren und mit Hilfe der Magnetpartikelspektroskopie ohne Einfluss auf die Zellvitalität zu charakterisieren. Auch eine mögliche Verwendung von VSOP als „drug delivery systems“ [129] ist denkbar. Durch ihre zügige Aufnahme in atherosklerotische Plaques mit dem Effekt eines negativen Kontrasts in der T2\*-Sequenz im Mausmodell, sind sie ein vielversprechender Kandidat für ein neuartiges Kontrastmittel in der MRT-Bildgebung der Atherosklerose. Durch die Möglichkeit, VSOP zeitgleich für die Anfertigung einer MR-

Angiographie zu nutzen, bieten sie zusätzlichen Informationsgewinn in der klinischen Praxis. Auch sind die Potenziale für Post-Processing der MRT-Bilder sowie Entwicklung neuartiger Untersuchungsprotolle und –sequenzen nicht ausgeschöpft und bieten weitere Möglichkeiten der Signaloptimierung.

Nachdem der verantwortliche Aufnahmemechanismus durch unsere Versuchsergebnisse bereits deutlich genauer charakterisiert werden konnte, sind die Abläufe auf molekularer Ebene ebenso wie der Oberflächenrezeptor für VSOP weiterhin nicht eindeutig identifiziert. Hierfür werden weitere experimentelle Untersuchungen z.B. mit selektiver Blockade von Zellrezeptoren oder RNA-Interferenz notwendig sein.

## Literaturverzeichnis

1. Lobstein J. Traité d'Anatomie Pathologique II. Paris: Levrault. 1833.
2. World Health Organization Study Group. Classification of atherosclerotic lesions. WHO Technical Report Series. 1958;143:1 - 20.
3. Herold G. Innere Medizin. 2015;240, 809, 15, 962, .
4. World Health Organization Study Group. Global Status Report on non-communicable diseases. 2014:9.
5. Bundesamt S. Todesursachen in Deutschland. 2020.
6. World Health Organization. Global Burden Disease Report 2004 update - Part 2: Causes of death. 2004:23 - 5.
7. Statistisches Bundesamt. Gesundheit - Krankheitskosten, Ergebnis 23631-0001. 2020.
8. Society IA. Harmonized Clinical Guidelines on Prevention of Atherosclerotic Vascular Disease - Executive Summary. 2003:9 - 11.
9. Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. 1856:484 - 6.
10. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol. 1977;86(3):675-84.
11. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science. 1973;180(4093):1332-9.
12. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation. 2001;104(3):365-72.
13. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. Science. 1976;193(4258):1094-100.
14. Moeslinger T, Friedl R, Volf I, Brunner M, Baran H, Koller E, Spieckermann PG. Urea induces macrophage proliferation by inhibition of inducible nitric oxide synthesis. Kidney Int. 1999;56(2):581-8.
15. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. J Clin Invest. 1976;58(3):731-41.
16. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. N Engl J Med. 1974;291(11):537-43.

17. Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(1):23-32.
18. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112(10):1018-31.
19. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2004;85(1):9-23.
20. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.
21. Seimon TA, Nadolski MJ, Liao X, Magallon J, Nguyen M, Feric NT, Koschinsky ML, Harkewicz R, Witztum JL, Tsimikas S, Golenbock D, Moore KJ, Tabas I. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell metabolism.* 2010;12(5):467-82.
22. Kaplan M, Aviram M. Macrophage plasma membrane chondroitin sulfate proteoglycan binds oxidized low-density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 2000;149(1):5-17.
23. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999;340(2):115-26.
24. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2493-503.
25. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995;92(3):657-71.
26. Richardson PD, Davies MJ, Born GVR. INFLUENCE OF PLAQUE CONFIGURATION AND STRESS DISTRIBUTION ON FISSURING OF CORONARY ATHEROSCLEROTIC PLAQUES. *The Lancet.* 1989;334(8669):941-4.
27. Ouldzein H, Elbaz M, Roncalli J, Cagnac R, Carrie D, Puel J, Alibelli-Chemarin MJ. Plaque rupture and morphological characteristics of the culprit lesion in acute coronary syndromes without significant angiographic lesion: analysis by intravascular ultrasound. *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2012;61(1):20-6.
28. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1371-5.
29. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462-78.
30. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions

and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.

31. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1262-75.

32. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*. 2002;15(6):439-46.

33. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):200-4.

34. Collier BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):658-70.

35. Johnson JL, Newby AC. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(5):370-8.

36. Linton MF, Major AS, Fazio S. Proatherogenic role for NK cells revealed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):992-4.

37. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PloS one*. 2010;5(7):e11765.

38. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.

39. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E, de Winther MPJ. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):461-8.

40. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PloS one*. 2010;5(1):e8852.

41. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25(12):677-86.

42. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2014;262(1):153-66.

43. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med*. 1962;116:381-406.

44. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 1999;10(2):137-42.
45. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992;176(1):287-92.
46. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):317-26.
47. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical and experimental immunology*. 2005;142(3):481-9.
48. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
49. Reynolds HR, Srichai MB, Iqbal SN, Slater JN, Mancini GBJ, Feit F, Pena-Sing I, Axel L, Attubato MJ, Yatskar L, Kalhorn RT, Wood DA, Lobach IV, Hochman JS. Mechanisms of Myocardial Infarction in Women Without Angiographically Obstructive Coronary Artery DiseaseClinical Perspective. *Circulation*. 2011;124(13):1414-25.
50. Hong MK, Mintz GS, Popma JJ, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Leon MB. Limitations of angiography for analyzing coronary atherosclerosis progression or regression. *Ann Intern Med*. 1994;121(5):348-54.
51. Casscells W, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, Bearman G, Willerson JT. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet*. 1996;347(9013):1447-51.
52. Naghavi M, Madjid M, Gul K, Siadaty MS, Litovsky S, Willerson JT, Casscells SW. Thermography basket catheter: in vivo measurement of the temperature of atherosclerotic plaques for detection of vulnerable plaques. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;59(1):52-9.
53. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, Tsiamis E, Dernellis J, Toutouzas K, Stefanadi E, Toutouzas P. Thermal Heterogeneity Within Human Atherosclerotic Coronary Arteries Detected In Vivo: A New Method of Detection by Application of a Special Thermography Catheter. *Circulation*. 1999;99(15):1965-71.
54. Rzeszutko L, Legutko J, Kaluza GL, Wizimirski M, Richter A, Chyrchel M, Heba G, Dubiel JS, Dudek D. Assessment of culprit plaque temperature by intracoronary thermography appears inconclusive in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1889-94.

55. Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation*. 2001;103(4):604-16.
56. Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, Southern JF, Fujimoto JG. Optical coherence tomography for optical biopsy. Properties and demonstration of vascular pathology. *Circulation*. 1996;93(6):1206-13.
57. Fujimoto JG, Boppart SA, Tearney GJ, Bouma BE, Pitris C, Brezinski ME. High resolution in vivo intra-arterial imaging with optical coherence tomography. *Heart*. 1999;82(2):128-33.
58. Leschka S, Seitun S, Dettmer M, Baumüller S, Stolzmann P, Goetti R, Scheffel H, Feuchtner G, Wunnicke K, Wildermuth S, Oehlschlegel C, Marincek B, Jochum W, Alkadhi H. Ex vivo evaluation of coronary atherosclerotic plaques: Characterization with dual-source CT in comparison with histopathology. *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*. 2010;4(5):301-8.
59. Raggi P, Callister TQ, Cooil B, He Z-X, Lippolis NJ, Russo DJ, Zelinger A, Mahmorian JJ. Identification of Patients at Increased Risk of First Unheralded Acute Myocardial Infarction by Electron-Beam Computed Tomography. *Circulation*. 2000;101(8):850-5.
60. Administration USFaD. What are the Radiation Risks from CT? 2017.
61. Strahlenschutz Bf. Wie hoch ist die natürliche Strahlenbelastung in Deutschland? 2018.
62. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JI, Rodriguez OJ, Fayad ZA, Fallon JT, Badimon JJ. Atherosclerotic aortic component quantification by noninvasive magnetic resonance imaging: an in vivo study in rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(4):1149-54.
63. Saam T, Ferguson MS, Yarnykh VL, Takaya N, Xu D, Polissar NL, Hatsukami TS, Yuan C. Quantitative evaluation of carotid plaque composition by in vivo MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):234-9.
64. Fayad ZA, Nahar T, Fallon JT, Goldman M, Aguinaldo JG, Badimon JJ, Shinnar M, Chesebro JH, Fuster V. In Vivo Magnetic Resonance Evaluation of Atherosclerotic Plaques in the Human Thoracic Aorta. A Comparison With Transesophageal Echocardiography. 2000;101(21):2503-9.
65. Millon A, Mathevet JL, Bousset L, Faries PL, Fayad ZA, Douek PC, Feugier P. High-resolution magnetic resonance imaging of carotid atherosclerosis identifies vulnerable carotid plaques. *J Vasc Surg*. 2013;57(4):1046-51 e2.
66. Kerwin WS, O'Brien KD, Ferguson MS, Polissar N, Hatsukami TS, Yuan C. Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: a dynamic contrast-enhanced MR imaging study. *Radiology*. 2006;241(2):459-68.
67. Dweck MR, Puntmann VO, Vesey AT, Fayad ZA, Nagel E. MR Imaging of Coronary Arteries and Plaques. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2016;9(3):306-16.

68. Camici PG, Rimoldi OE, Gaemperli O, Libby P. Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque. *European heart journal*. 2012;33(11):1309-17.
69. McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, Williamson EE, Eckel LJ. Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology*. 2015;275(3):772-82.
70. Murata N, Gonzalez-Cuyar LF, Murata K, Fligner C, Dills R, Hippe D, Maravilla KR. Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results From 9 Patients With Normal Renal Function. *Invest Radiol*. 2016;51(7):447-53.
71. Wáng Y-XJ, Schroeder J, Siegmund H, Idée J-M, Fretellier N, Jestin-Mayer G, Factor C, Deng M, Kang W, Morcos SK. Total gadolinium tissue deposition and skin structural findings following the administration of structurally different gadolinium chelates in healthy and ovariectomized female rats. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2015;5(4):534-45.
72. Taupitz M, Schnorr J, Abramjuk C, Wagner S, Pilgrimm H, Hünigen H, Hamm B. New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: Preclinical results in rats and rabbits. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2000;12(6):905-11.
73. Pharma BS. Fachinformation Resovist 2007.
74. Trivedi RA, JM UK-I, Graves MJ, Cross JJ, Horsley J, Goddard MJ, Skepper JN, Quartey G, Warburton E, Joubert I, Wang L, Kirkpatrick PJ, Brown J, Gillard JH. In vivo detection of macrophages in human carotid atheroma: temporal dependence of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced MRI. *Stroke*. 2004;35(7):1631-5.
75. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ, van Engelshoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;107(19):2453-8.
76. Ruehm SG, Corot C, Vogt P, Kolb S, Debatin JF. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001;103(3):415-22.
77. Roohi F, Lohrke J, Ide A, Schütz G, Dassler K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:4447-58.
78. Schnorr J, Wagner S, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. Preclinical characterization of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as a blood pool contrast medium for MR angiography. *Academic radiology*. 2002;9 Suppl 2:S307-9.
79. Ludwig A, Poller WC, Westphal K, Minkwitz S, Lattig-Tunnemann G, Metzkwow S, Stangl K, Baumann G, Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Stangl V. Rapid binding of

electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(2):328.

80. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Kravec I, Pilgrimm H, Bergmann-Fritsch H, Hamm B. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2004;39(7):394-405.

81. Wagner M, Wagner S, Schnorr J, Schellenberger E, Kivelitz D, Krug L, Dewey M, Laule M, Hamm B, Taupitz M. Coronary MR angiography using citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as blood-pool contrast agent: initial experience in humans. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2011;34(4):816-23.

82. Chan TW, Eley C, Liberti P, So A, Kressel HY. Magnetic resonance imaging of abscesses using lipid-coated iron oxide particles. *Invest Radiol*. 1992;27(6):443-9.

83. Gaglia JL, Guimaraes AR, Harisinghani M, Turvey SE, Jackson R, Benoist C, Mathis D, Weissleder R. Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients. *J Clin Invest*. 2011;121(1):442-5.

84. Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Dodd SJ, Williams M, Griffith BP, Ho C. Macrophage accumulation associated with rat cardiac allograft rejection detected by magnetic resonance imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles. *Circulation*. 2001;104(8):934-8.

85. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse M, Semmler W, Wolf KJ. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Invest Radiol*. 2000;35(8):460-71.

86. Vellinga MM, Oude Engberink RD, Seewann A, Pouwels PJ, Wattjes MP, van der Pol SM, Pering C, Polman CH, de Vries HE, Geurts JJ, Barkhof F. Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain*. 2008;131(Pt 3):800-7.

87. Ahrens ET, Bulte JW. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):755-63.

88. Thakur ML, Lavender JP, Arnot RN, Silvester DJ, Segal AW. Indium-111-labeled autologous leukocytes in man. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1977;18(10):1014-21.

89. Heyn C, Ronald JA, Mackenzie LT, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ. In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn Reson Med*. 2006;55(1):23-9.

90. Weizenecker J, Borgert J, Gleich B. A simulation study on the resolution and sensitivity of magnetic particle imaging. *Physics in Medicine & Biology*. 2007;52(21):6363.

91. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(38):14265-70.
92. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*. 2009;8:543.
93. Wagner S, Schnorr J, Ludwig A, Stangl V, Ebert M, Hamm B, Taupitz M. Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:767-79.
94. Makowski MR, Varma G, Wiethoff AJ, Smith A, Mattock K, Jansen CH, Warley A, Taupitz M, Schaeffter T, Botnar RM. Noninvasive assessment of atherosclerotic plaque progression in ApoE-/- mice using susceptibility gradient mapping. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4(3):295-303.
95. Zini C, Venneri MA, Miglietta S, Caruso D, Porta N, Isidori AM, Fiore D, Gianfrilli D, Petrozza V, Laghi A. USPIO-labeling in M1 and M2-polarized macrophages: An in vitro study using a clinical magnetic resonance scanner. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(8):5823-8.
96. H. P. Superparamagnetische Teilchen mit vergrößerter T1-Relaxivität, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung. 1997.
97. Poller WC, Ramberger E, Boehm-Sturm P, Mueller S, Möller K, Löwa N, Wiekhorst F, Wagner S, Taupitz M, Schellenberger E, Baumann G, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Uptake of citrate-coated iron oxide nanoparticles into atherosclerotic lesions in mice occurs via accelerated transcytosis through plaque endothelial cells. *Nano Research*. 2016;9(11):3437-52.
98. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H-B. Polarizing Macrophages In Vitro. In: Rousset G, editor. *Macrophages: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 119-26.
99. Poller WC, Löwa N, Wiekhorst F, Taupitz M, Wagner S, Möller K, Baumann G, Stangl V, Trahms L, Ludwig A. Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2016;12(2):337-46.
100. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *European journal of immunology*. 1979;9(4):301-6.
101. Hirsch S, Austyn JM, Gordon S. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J Exp Med*. 1981;154(3):713-25.
102. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008;83(1):14.1.1-1.

103. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*. 2006;177(10):7303-11.
104. Sarah R. Snyder UH-BB. Characterization of Magnetic Nanoparticles for Therapy and Diagnostics. 2011.
105. Berndt D, Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Stangl V, Paul F, Wagner S, Wuerfel JT, Sack I, Ludwig A, Infante-Duarte C. Inflammation-induced brain endothelial activation leads to uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via sulfated glycosaminoglycans. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2017;13(4):1411-21.
106. Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, Schnorr J, Hauptmann R, Kratz H, Hamm B, Wagner S. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd<sup>3+</sup> to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2013;8(2):108-16.
107. Satomi T, Ogawa M, Mori I, Ishino S, Kubo K, Magata Y, Nishimoto T. Comparison of contrast agents for atherosclerosis imaging using cultured macrophages: FDG versus ultrasmall superparamagnetic iron oxide. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54(6):999-1004.
108. Rogers WJ, Basu P. Factors regulating macrophage endocytosis of nanoparticles: implications for targeted magnetic resonance plaque imaging. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):67-73.
109. Ambrosius M. Analyse von Glykosaminoglykanen in humanen Zellen und Körperflüssigkeiten. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Universität Bielefeld 2008.
110. Makatsori E, Lamari F, Theocharis A, Anagnostides S, Hjerpe A, Tsegenidis T, Karamanos N. Large matrix proteoglycans, versican and perlecan, are expressed and secreted by human leukemic monocytes 2003. 3303-9 p.
111. Krpetić Ž, Nativo P, Prior IA, Brust M. Acrylate-Facilitated Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Small*. 2011;7(14):1982-6.
112. Scharlach C. Synthese verschiedener elektrostatisch stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel und Vergleich der Eignung für die zielgerichtete MR-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Universität Bielefeld. 2014.
113. Carrstensen H, Muller RH, Muller BW. Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 1992;11(5):289-97.
114. 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.

European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 1998;46(3):255-63.

115. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(10):958-66.

116. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(27):10340-5.

117. Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing, II, Lin VS. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS nano*. 2011;5(2):1366-75.

118. Schekman R, Singer SJ. Clustering and endocytosis of membrane receptors can be induced in mature erythrocytes of neonatal but not adult humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(11):4075-9.

119. Ronald JA, Chen Y, Belisle AJ, Hamilton AM, Rogers KA, Hegele RA, Misselwitz B, Rutt BK. Comparison of gadofluorine-M and Gd-DTPA for noninvasive staging of atherosclerotic plaque stability using MRI. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2(3):226-34.

120. Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1996;74(7):787-800.

121. Christianson HC, Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology*. 2014;35:51-5.

122. Poon GM, Garipey J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 4):788-93.

123. Thapa R, Wilson GD. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem cells international*. 2016;2016:2087204.

124. Fujimoto T, Kawashima H, Tanaka T, Hirose M, Toyama-Sorimachi N, Matsuzawa Y, Miyasaka M. CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan2001.

125. Kawashima H, Hirose M, Hirose J, Nagakubo D, Plaas AHK, Miyasaka M. Binding of a Large Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Proteoglycan, Versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(45):35448-56.

126. Lo Y-L, Sung K-H, Chiu C-C, Wang L-F. Chemically Conjugating Polyethylenimine with Chondroitin Sulfate to Promote CD44-Mediated Endocytosis for Gene Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(2):664-76.

127. Qhattal HSS, Liu X. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8(4):1233-46.

128. Vachon E, Martin R, Plumb J, Kwok V, Vandivier RW, Glogauer M, Kapus A, Wang X, Chow CW, Grinstein S, Downey GP. CD44 is a phagocytic receptor. *Blood*. 2006;107(10):4149-58.
129. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;47(1):65-81.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Konstantin Möller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Aufnahmemechanismen von elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln in Atherosklerose-assoziierte Monozyten und Makrophagen“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Konstantin Möller hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** K. Möller, W. C. Poller, M. Taupitz, S. Wagner, G. Baumann, V. Stangl, and A. Ludwig, „Binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to monocytes and macrophages – implications for atherosclerotic plaque imaging“, Poster auf dem Wissenschaftlichen Jahreskongress der DGK in Mannheim 2015

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente, Gestaltung und Präsentation des Posters

**Publikation 2:** Wolfram C. Poller†, Norbert Löwa†, Frank Wiekhorst, Matthias Taupitz, Susanne Wagner, Konstantin Möller, Gert Baumann, Verena Stangl, Lutz Trahms, and Antje Ludwig, „Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy“, J. Biomed. Nanotechnol. 12, 1–10, 2016

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der MPS-Messungen in Zusammenarbeit mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt

**Publikation 3:** Wolfram C. Poller, Evelyn Ramberger, Philipp Boehm-Sturm, Susanne Mueller, Konstantin Möller, Norbert Löwa, Frank Wiekhorst, Susanne Wagner, Matthias Taupitz, Eyk Schellenberger, Gert Baumann, Karl Stangl, Verena Stangl, and Antje Ludwig, „Uptake of citrate-coated iron oxide nanoparticles into atherosclerotic lesions in mice occurs via accelerated transcytosis through plaque endothelial cells“, Nano Research. 2016-7-18, 2016

Beitrag im Einzelnen: Präparation der PBMC, Einbettung für elektronenmikroskopische Untersuchungen und elektronenmikroskopische Auswertung des VSOP-Gehalts, Erstellung von Abb. 3b, Mitarbeit beim Tierversuch

**Publikation 4:** Wolfram Christian Poller, Melanie Pieber, Philipp Boehm-Sturm, Evelyn Ramberger, Vasileios Karampelas, Konstantin Möller, Moritz Schleicher, Frank Wiekhorst, Norbert Löwa, Susanne Wagner, Jörg Schnorr, Matthias Taupitz, Karl Stangl, Verena Stangl, and Antje Ludwig, „ Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice “, Nanomedicine. 14(8):2575-2586, 2018;

Beitrag im Einzelnen: Zellkulturversuche zur Untersuchung eines Einflusses des  
XXI

Makrophagenphänotyps auf die VSOP-Aufnahme, Bereitstellung der Daten zur Erstellung von  
Abb. 5b

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Verena Stangl für die Mitbetreuung sowie die konstruktive Kritik während der wöchentlichen Labortreffen. Mein ganz besonderer Dank gebührt PD Dr. Antje Ludwig für die langjährige Betreuung der Promotionsarbeit. Durch Ihre Bereitschaft, mir mit ihrer langjährigen Forschungserfahrung jederzeit beratend zur Seite zu stehen, war sie maßgeblich an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt.

Ich danke ebenfalls Susanne Metzkwow, Anke Stach und Andrea Weller für die gemeinsame Zeit im Forschungslabor, die Einarbeitung in die zahlreichen Labortechniken, die netten Gespräche zwischendurch und das mehrfache Korrekturlesen mit größter Sorgfalt.

Mein Dank geht ebenfalls an Dr. Wolfram Poller, der mit seinem Tatendrang und seinen Erfahrungen eine Bereicherung für unsere Forschungsprojekte war. Gerne habe ich zwischenzeitliche Wartezeiten mit gemeinsamen Unterhaltungen überbrückt.

Meine Wertschätzungen gehen ebenfalls an Dr. Norbert Löwa und Dr. Frank Wiekhorst von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin für die problemlose Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes.

Ich möchte mich auch bei meinen Mitdoktoranden Sebastian Au und Christian Mieville bedanken, die mir geholfen haben, Frustrationen abzubauen und meine Zeit am CCR bereichert haben. Mein besonderer Dank gebührt Evelyn Ramberger, mit der ich immer gerne zusammengearbeitet habe und die mich sehr bei der Durchführung der Versuche unterstützt hat. Ganz herzlich danke ich auch Max Pötzsch, dem ich die Vermittlung des Promotionsthemas zu verdanken habe und der mich jederzeit auch in schweren Zeiten konstruktiv und mit viel Geduld unterstützt hat.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Otto-Hess-Promotionsstipendiums bei der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinem Vater Dr. Dr. Bernd Möller, der mir mit seinen Lebenserfahrungen viele gute Ratschläge geben konnte und jederzeit ein offenes Ohr für Probleme hatte. Immer wieder hat er mir neue Motivation gegeben, diese Arbeit abzuschließen. Er wäre sicher stolz.