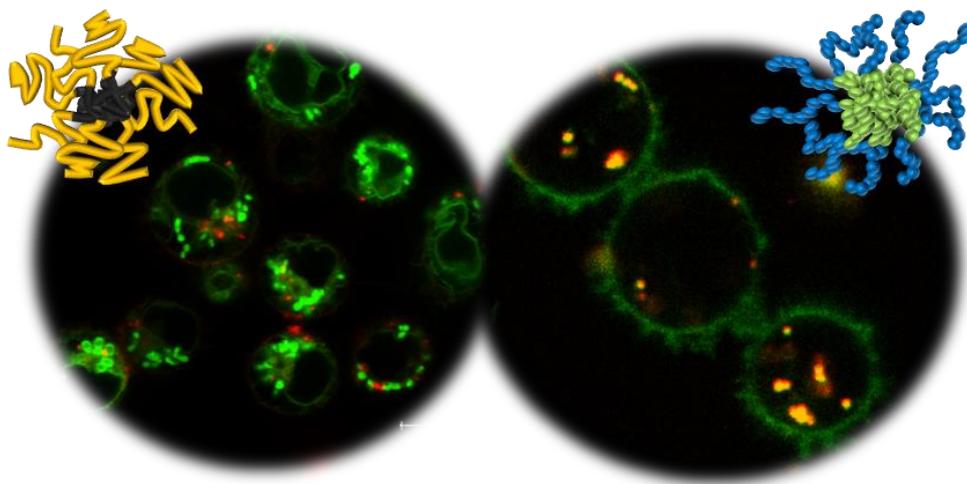


Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in CD8⁺ T-Zellen



DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Marleen Willig



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in CD8⁺ T-Zellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Diese Doktorarbeit wurde angefertigt am

Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

Marleen Willig

Geb. in Freudenstadt



UNIVERSITÄTS**medizin.**
MAINZ

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Max Planck Institute for Polymer Research



1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. Volker Mailänder

Center of Translational Nanomedicine, Universitätsmedizin Mainz

Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

2. Gutachterin:

Prof. Dr. Jacqueline Trotter

Institut für Zoologie / Molekulare Zellbiologie

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Hans Zischler

*„ Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss,
um zu wissen, wie wenig man weiß.“*

- Werner Heisenberg

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2013 bis September 2016 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz und an der Universitätsmedizin Mainz erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen (auch Internet) entnommen sind, habe ich als solche eindeutig kenntlich gemacht.

Mainz, den 27.10.2016

(Marleen Willig)

Zusammenfassung

Mit zunehmendem Interesse wird die Funktion der CD8⁺ T-Zellen bei Tumorerkrankungen erforscht, da diese T-Zellen Krebszellen erkennen und eliminieren können. Die zentrale Stellung der CD8⁺ T-Zellen bei der Erkennung von Krebszellen, macht sie zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für neuartige Immuntherapien. In den letzten Jahren hat die Wichtigkeit nanodimensionaler Transportsysteme in der biomedizinischen Forschung deutlich zugenommen, da diese als Trägersystem für Wirkstoffe eingesetzt und durch spezifische Oberflächenmodifizierungen an bestimmte Zellpopulationen adressiert werden können. Voraussetzung dafür ist die effiziente *in vitro* Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in die Zielzellen.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche nanodimensionale Trägersysteme für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen, hinsichtlich Zytotoxizität, Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Verbleib getestet. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sowohl Blockcopolymere mit TPP-Modifizierung als auch kationische Nanohydrogele von CD8⁺ T-Zellen aufgenommen wurden, da diese Zellen dafür bekannt sind kaum nanodimensionale Trägersysteme aufzunehmen.

Die Aufnahme der Blockcopolymere und kationischen Nanohydrogelen war konzentrations- und zeitabhängig. Weiterhin waren beide nanodimensionale Trägersysteme biokompatibel. Als möglicher Aufnahmeweg erwies sich die direkte Translokation und/oder die unspezifische Endozytose, da keine Hinweise auf eine spezifische Endozytose oder Makropinozytose gefunden wurden. Beide nanodimensionale Trägersysteme eignen sich als Trägersysteme für siRNA. Die Aufnahme von siRNA als Komplexe konnte für die Blockcopolymere-TPP mittels cLSM nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Aufnahme Ovalbumin Kapseln in CD8⁺ T-Zellen untersucht. Ovalbumin Kapseln sind biokompatibel und mittels Proteasen enzymatisch abbaubar. Die Herstellung über die inverse Miniemulsionstechnik ermöglichte eine IL-7-Oberflächenmodifizierung für die spezifische Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Veränderung des IL-7 keinen Einfluss auf die Biofunktionalität des Zytokins hat. Jedoch konnte, unabhängig der IL-7-Modifizierung, keine Aufnahme der Ovalbumin Kapseln in T-Zellen nachge-

wiesen werden.

In dieser Arbeit konnten zwei relevante chemischen Eigenschaften identifiziert werden, die einen positiven Einfluss auf die Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in CD8⁺ T-Zellen haben. So erwiesen sich Größe, kleiner als 100 nm und eine kationische Gesamtladung als wichtige Faktoren bezüglich der T-Zell-Aufnahme.

Abstract

The role of CD8⁺ T-cells in tumor diseases is of increasing interest, since the discovery that they are able to recognize and eliminate cancer cells. The key role of T-cells in recognizing cancer cells makes them a promising candidate for novel immunotherapies. During the last decades, the importance of nanocarriers with specific targeting as drug delivery systems for medical applications has been increasing steadily. The major requirement is the efficient *in vitro* uptake of nanocarriers in the target cells.

In this work, different nanocarriers have been tested regarding cytotoxicity, uptake mechanism and intracellular trafficking. For the first time it has been shown that block copolymers with TPP modification and cationic nanohydrogels are taken up by CD8⁺ T-cells.

The uptake of block copolymers and cationic nanohydrogels was dependent on concentration and time. Furthermore, both nanocarriers were biocompatible. There was no evidence of specific endocytosis or macropinocytosis found, therefore possible uptake mechanisms are direct translocation and/or unspecific endocytosis. Both nanocarriers were suitable siRNA delivery systems and the uptake of siRNA as complexes was shown for block copolymers with TPP.

In addition, the uptake of ovalbumin capsules in CD8⁺ T-cells was investigated. Ovalbumin capsules are biocompatible and degradable by enzymes such as proteases. The preparation via inverse miniemulsion technique enabled an IL-7 surface modification leading to specific uptake in CD8⁺ T-cells. The chemical modification of IL-7 has no influence on the biofunctionality of the cytokine. However, no uptake of ovalbumin capsules was detected irrespectively of the IL-7 modification.

In this work, two relevant chemical properties of nanocarriers were identified which have a positive impact on the uptake in CD8⁺ T-cells. It can be concluded that a size smaller than 100 nm and an overall cationic charge are important factors for the uptake in T-cells.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Zusammenfassung und Abstract

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis IV

Tabellenverzeichnis VI

Abkürzungsverzeichnis VII

1. Einleitung 1

1.1. Nanomedizin 1

1.1.1. Nanodimensionale Trägersysteme als Wirkstofftransportsysteme 3

1.2. Intrazelluläre Aufnahmemechanismen 5

1.3. Periphere mononukleäre Blutzellen 10

1.4. CD8⁺ T-Zellen und ihre Funktion 12

1.5. CD8⁺ T-Zellen und die Aufnahme von Nanopartikeln 20

1.6. Zelllinien 21

1.6.1. Jurkat Zellen 21

1.6.2. Murine 2E8 Zellen 22

1.7. Herstellung nanodimensionaler Trägersysteme 22

1.7.1. Blockcopolymer (HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA 23

1.7.2. Kationische Nanohydrogele zur Selbstorganisation 23

1.7.3. Miniemulsionstechnik 24

1.7.4. Ovalbumin Kapseln 25

1.8. Motivation 27

2. Methoden 28

2.1. Allgemeine und spezielle Zellkultur von Suspensionszellen 28

2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen 28

2.1.2. Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus aufkonzentriertem peripheren Blut 29

2.1.3. Kultivierung von humanen nicht adhärennten PBMCs 30

2.1.4. Kultivierung von humanen Jurkat Zellen 30

2.1.5. Kultivierung von murinen 2E8 Zellen 30

2.2.	Generierung und Stimulierung von humanen CD8 ⁺ T-Zellen	31
2.2.1.	Aufreinigung humaner CD8 ⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zell- sortierung	31
2.3.	Nanodimensionale Trägersysteme	32
2.3.1.	Blockcopolymerie via RAFT Polymerisation	32
2.3.2.	Kationische Nanohydrogele via Selbstorganisation	34
2.3.3.	Ovalbumin Nanokapseln via Miniemulsionstechnik	35
2.4.	Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in CD8 ⁺ T-Zellen	38
2.4.1.	Analyse der Aufnahme und Zytotoxizität der nanodimensiona- len Trägersystemen im Durchflusszytometer	38
2.4.2.	Analyse der Aufnahme und Verbleib der nanodimensionalen Trägersystemen im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop	40
2.4.3.	Analyse der metabolischen Aktivität der nanodimensionalen Trägersystemen nach der Aufnahme	41
2.5.	Analyse der Kolokalisation in intrazellulären Kompartimenten	42
2.5.1.	Kolokalisation mit Mitochondrium	42
2.5.2.	Kolokalisation im frühen Endosomen	42
2.5.3.	Kolokalisation bei Transferrin/Dextran Aufnahme	43
2.5.4.	Kolokalisation im Lysosom	43
2.6.	Biofunktionalität von modifiziertem IL-7	43
2.6.1.	<i>CellTrace Violet</i> Proliferationsassay	44
2.6.2.	BrdU Proliferationsassay	45
2.6.3.	Tamra-DBCO-Farbstoff zum Nachweis von IL-7-Azid	47
3.	Ergebnisse und Diskussion	48
3.1.	Blockcopolymerie (HPMA- <i>s</i> -APMA)- <i>b</i> -GPMA zur Aufnahme in CD8 ⁺ T-Zellen	48
3.1.1.	Biokompatibilität der Blockcopolymerie	49
3.1.2.	Aufnahmestudien der Blockcopolymerie in CD8 ⁺ T-Zellen	50
3.1.3.	Zeitkinetik der Aufnahme von Blockcopolymerie in CD8 ⁺ T-Zellen	52
3.1.4.	Konzentrationskinetik der Aufnahme von Blockcopolymerie in CD8 ⁺ T-Zellen	55
3.1.5.	Intrazellulärer Verbleib der Blockcopolymerie in CD8 ⁺ T-Zellen	57
3.1.6.	Kolokalisationsstudien zur Aufnahme von siRNA-Blockcopolymer- Komplexe in CD8 ⁺ T-Zellen	68
3.2.	Kationische Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA	70
3.2.1.	Biokompatibilität der Nanohydrogele	71
3.2.2.	Aufnahmestudien der Nanohydrogele in CD8 ⁺ T-Zellen	72
3.2.3.	Zeitkinetik der Aufnahme von Nanohydrogelen in CD8 ⁺ T-Zellen	78
3.2.4.	Konzentrationskinetik der Aufnahme von Nanohydrogelen in CD8 ⁺ T-Zellen	80

3.3. Vergleich Blockcopolymere und Nanohydrogele als siRNA-Trägersysteme für T-Zellen	82
3.4. Oberflächenmodifizierung von Ovalbumin Kapseln	83
3.4.1. Biokompatibilität der Ovalbumin-IL7-Kapseln	84
3.4.2. Biofunktionalität des IL-7 nach Azid-Modifizierung	85
3.4.3. Biofunktionalität des IL-7 nach DBCO-Funktionalisierung	88
3.4.4. Zellaufnahme von modifizierten Ovalbumin Kapseln	89
4. Fazit und Ausblick	93
Literatur	94
Lebenslauf	112
Appendices	113
Anhang A. Verwendete Materialien	113
A.1. Geräte	113
A.2. Verbrauchsmaterialien	114
A.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen	114
A.4. Primäre Zellen und Zelllinien	116
A.5. siRNA	116
A.6. Antikörper	117
A.7. Software und Programme	118

Abbildungsverzeichnis

1.	Nanodimensionale Trägersysteme als Wirkstofftransportsysteme . . .	4
2.	Komplexierung von siRNA	5
3.	Übersicht der Aufnahmemechanismen	6
4.	Übersicht der Blutzellen	11
5.	Buffy-Coat Aufreinigung	12
6.	Immunologische Synapse	14
7.	Zytotoxische Funktion der T-Zellen	15
8.	Prinzip der inversen Miniemulsion	25
9.	Synthese (HPMA-s-APMA)-b-GPMA Blockcopolymer mit TPP Modifikation	33
10.	Schematische Zusammensetzung der kationischen Nanohydrogele .	35
11.	Schematische Herstellung von Ovalbumin Kapseln	37
12.	Umsetzung MTS zu Formazan	41
13.	Stukturformel BrdU und Thymidin	46
14.	Schematische Darstellung der Komplexierung von Blockcopolymeren und siRNA	48
15.	Zytotoxizität der Blockcopolymeren mit TPP Modifizierung	50
16.	Zellaufnahme der Blockcopolymeren mit/ohne TPP Modifizierung . . .	51
17.	Vergleich der Aufnahme Blockcopolymeren mit/ohne TPP	52
18.	Zeitkinetik Blockcopolymeren	54
19.	Konzentrationskinetik der Aufnahme von Blockcopolymeren	56
20.	<i>Live cell imaging</i> der Blockcopolymerenaufnahme	58
21.	Dextranaufnahme via Makropinozytose	60
22.	Transferrinaufnahme via Clathrin-abhängiger Endozytose	61
23.	Kolokalisation im frühen Endosomes	63
24.	Möglichkeiten der direkten Translokation	64
25.	Direkte Translokation der Blockcopolymeren	65
26.	Kolokalisation in Lysosomen	67
27.	Prinzip eines <i>z-Stacks</i>	68
28.	Zellaufnahme von Blockcopolymer-TPP-siRNA-Komplexe	69
29.	Freisetzung von siRNA aus Nanohydrogelen	71
30.	Messung metabolischer Aktivität mittels MTS-Assay - Nanohydrogele	72
31.	Zellaufnahme Nanohydrogele	74
32.	Quantifizierung der Nanohydrogelaufnahme im Durchflusszytometer	75
33.	Unspezifischer Aufnahmemechanismus	76
34.	Aufnahme unterschiedlicher siRNA-Nanohydrogel-Komplexe	77
35.	Zeitkinetik der Nanohydrogelaufnahme	79
36.	Konzentrationskinetik der Aufnahme von Nanohydrogelen	81
37.	Messung metabol. Aktivität mittels MTS-Assay - Ovalbumin Kapseln	84

38. Biofunktionalität des IL-7-Azid	86
39. Fluoreszenzaufnahmen des IL-7-Rezeptors	87
40. Biofunktionalität des IL-7-DBCO	89
41. Fluoreszenzaufnahmen von Ovalbumin Kapseln in CD8 ⁺ T-Zellen . .	90
42. Fluoreszenzaufnahmen von Ovalbumin Kapseln in CD8 ⁺ T-Zellen und HEK293T Zellen	92

Tabellenverzeichnis

2.	Veränderung der T-Zell-Funktion durch Erschöpfung	18
3.	Verwendete Zellkulturmedien	28
4.	Charakterisierungsdaten Blockcopolymer	32
5.	Charakterisierungsdaten Nanohydrogele	34
6.	Charakterisierungsdaten Ovalbumin Kapseln	36
8.	Verwendete Geräte.	113
9.	Verwendete Verbrauchsmaterialien.	114
10.	Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen.	114
11.	Verwendete primäre Zellen und Zelllinien.	116
12.	Verwendete siRNA.	116
13.	Verwendete Antikörper	117
14.	Verwendete Software und Programme.	118

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ACVA	4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid), 4,4'-azobis(4-cyanovalerinsäure)
AIBN	2,2'-azobis(isobutyronitrile), 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)
AK	Arbeitskreis
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen presenting cells, Antigen-präsentierende Zellen
APMA	Aminopropylmethacrylamid
ATCC	American Type Culture Collection
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
CCPs	Cell penetrating peptide, zellpenetrierendes Peptid
CD	Cluster of Differentiation
cLSM	Confocal Laser Scanning Microscope, konfokale Laserrastermikroskopie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTA	Chain transfer agent, Kettentransferagenz
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4
CTP	4-cyano-4-((phenylcarbonothioyl)thio)pentansäure
DBCO	Dibenzobicyclooctyne
DC	Dendritic cells, dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Leibniz-Institut
EEA1	Early Endosomes Antigen 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay, Affinitätselektrophorese
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FBS	Fötales Bovines Serum
FCM	Flow cytometry, Durchflusszytometrie
FDA	Food and Drug Administration

Fortsetzung nächste Seite

Abkürzung	Bezeichnung
FITC	Fluorescein
GMCSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
GPMA	Guanidionopropylmethacrylamid
GTPase	Familie an Hydrolasen, die GTP hydrolysieren
GTP	Guanosintriphosphat
HPMA	Hydroxypropylmethacrylamid
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
iDCs	Immature dendritic cells, immature dentritische Zellen
I.E.	internationale Einheit
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-7	Interleukin-7
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium, Zellkulturmedium
IVT-RNA	In vitro transkribierte RNA
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus, Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
MACS	Magnetic Cell Separation
MFI	Mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MPIP	Max-Planck-Institut für Polymerforschung
MTS	Tetrazoliumsalz, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OKT3	Anti-CD3 Antikörper, Klon OKT3
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells, periphäre mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Saline ohne Calcium und Magnesium
PE	Phycoerythrin
PEG4	Polyethylenglycol, Kettenlänge 4
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PerCP	Peridinin Chlorophyll

Fortsetzung nächste Seite

Abkürzung	Bezeichnung
PD-1	Programmed cell death I, programmierter Zelltod I
PDI	Perylendiimid
PF14	PepFect14, zellpenetrierendes Peptid
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
Rab5	Ras-related Protein 5
RAFT	reversible addition-fragmentation chain transfer, reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
siRNA	Short interfering RNA, kleine eingereifte RNA
SPAAC	Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition
TDI	Toluylendiisocyanat
TPP	Triphenylphosphat
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T-Zellen	T-Lymphozyten
U	Unit, Einheit
WGA	Wheat Germ Agglutinin, Weizenkeim-Agglutinin
2E8	Murine Lymphoblast Zelllinie (B-Lymphozyten)
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
%wt	Weight percent, Gewichtsprozent

1. Einleitung

In den letzten Jahren haben sich Nanotechnologien als Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhundert etabliert. Besonders die nanoskalige Größe von 1 bis 100 nm, vermittelt Nanomaterialien Eigenschaften, die viele Forschungsbereiche revolutionieren können [1]. In der Tat, werden bereits heute schon viele Nanopartikel in der Medizin, Biotechnologie, Elektronik, Kosmetik und Lebensmittelindustrie verwendet [2]. So werden Sonnencremes mit Nanopartikeln aus Titanoxid und Zinkoxid versetzt, um den UV-Schutz zu verbessern. Silbernanopartikel finden als antibakterieller Zusatz Anwendung in medizinischen Geräten und Waschmitteln. Während nanodimensionales Eisenoxid als Kontrastmittel Anwendung in Kernspintomographien gefunden hat. Weiterhin sind Nanopartikel als Oberflächenbeschichtungen in Alltagsgegenständen wie Kleidung, Autozubehör oder Farben zu finden [2, 3]. So werden Titanoxid-Nanopartikel in die Fasern von Kleidung eingearbeitet, um Funktionskleidung mit UV-Schutz herzustellen. Speziell beschichtetes Druckerpapier erlaubt hohe Druckgeschwindigkeiten, da eine Schicht aus Siliziumoxid-Nanopartikel das schnelle Trocknen der Tinte fördert [3]. Die Nanomaterialien und -technologien sind omnipräsent und aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Sie bieten durch ihre weitgefächerten Einsatzmöglichkeiten optimale Voraussetzungen für Innovationen in allen Lebensbereichen.

Die Applikation von nanoskaligen Materialien als therapeutische Ansätze ist vermutlich das interessanteste Feld der Nanotechnologien. Synthetisierte Nanopartikel sind ein vielversprechendes Werkzeug und werden aktuell erforscht als Wirkstofftransportsysteme, für die Diagnostik, Bilddarstellung und in Medizinprodukte, wie Implantate [1].

1.1. Nanomedizin

Besonders in der Medizin werden große Erwartungen und Hoffnungen in die Nanotechnologien gesetzt. Neben Medikamenten, die durch Nanotechnologien etabliert wurden, besteht sehr großes Interesse in der Entwicklung von neuartigen Therapiemöglichkeiten für bisher kaum heilbare Erkrankungen, wie Krebs, Diabetes, chroni-

sche Lebererkrankungen oder degenerative Erkrankungen.

Die geringe Größe der Nanopartikel ermöglicht die Überwindung von unterschiedlichen biologischen Barrieren und erhöht somit die Erreichbarkeit von Organen und Geweben [1]. Genauer gesagt, die Nanopartikel können in Interaktion mit Zellen, Organellen, Proteinen oder DNA treten. Jedoch werfen diese Möglichkeiten auch Fragen bezüglich der Unbedenklichkeit und Sicherheit von Nanopartikeln als Therapeutika auf [4]. Um auch zukünftig sichere nanodimensionale Produkte bereitzustellen, ist es absolut notwendig mehr Wissen über die Nano-Bio-Interaktionen zu erlangen. Diese beinhalten bspw. nanopartikuläre Zytotoxizität, zelluläre Aufnahme und Nanopartikel-Membran-Interaktionen [4].

Ein wichtiges Ziel ist es mehr Erkenntnisse zur Nano-Bio-Interaktion zu erlangen, um bessere neuartige nanodimensionale Wirkstoffträgersysteme zu entwickeln. Nanopartikel können aus unterschiedlichen Materialien wie Gold, Eisenoxid, Siliziumdioxid oder Titanoxid hergestellt sein. Oder aus organischen Polymeren wie Polystyrol, Polylactid, Polylactid-Coglycolid, oder Biopolymeren wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate [5, 6]. So unterschiedlich die Ausgangsmaterialien sind, so individuell sind die Eigenschaften und Einflüsse auf biologische Systeme. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass für jede Indikation, Zielzelle oder Gewebe, Wirkstoff und Applikationsart mit individuellen Systemen getestet und etabliert werden müssen [7].

Schon in den frühen 80iger Jahren entwickelten Forscher pH-abhängige nanodimensionale Wirkstofftransportsysteme basierend auf Lipiden [8]. Weitere Forschung und Entwicklung führte zur Zulassung des ersten FDA genehmigten nanodimensionalen Therapeutikum Doxil[®], welches 1995 auf den Markt kam. Dabei handelte es sich um Liposomen, die das Medikament Doxorubicin als Wirkstoff beinhalten [9]. Bis heute hat sich viel verändert und die nanodimensionale Wirkstofftransportsysteme sind viel spezialisierter bzgl. ihrer Funktion, Wirkort und Zielgewebe oder -zellart [10, 11]. So können zielgerichtet siRNA beladenen Nanopartikel in die Leber gebracht werden, um Leberfibrose zu behandeln [12]. Weiterhin kann durch die Verpackung des Medikaments Doxorubicin in Nanopartikel, die Blut-Hirn-Schranke durchwandert werden [13]. Oder die Verpackung des Chemotherapeutikum Paclitaxel mittels Albumin, welches deutlich die Löslichkeit des Medikaments erhöhte und somit den Verzicht auf allergieauslösende Lösungsvermittler ermöglichte, wurde 2008 unter dem Handelsnamen Abraxane zugelassen [14].

Von Vorteil wäre, wenn dieser zielgerichtete Transport für jede Gewebe oder Zellart funktionieren würde. Wie schwierig das ist, soll an dem Beispiel weiße Blutzellen erläutert werden. Die weißen Blutzellen unterteilen sich in verschiedene Untergruppen, wie B-Zellen, T-Zellen und Fresszellen. Von großen Erfolg ist die zielgerichtete Applikation von Nanopartikeln in Fresszellen, die aufgrund ihrer Funktion als Fresszellen eine große Anzahl an Nanopartikel aufnehmen können [15, 16, 17]. Im Vergleich dazu ist die Applikation von Nanopartikeln in T-Zellen herausfordernd, da ihre primäre Funktion nicht die Aufnahme von Partikeln ist, sondern die Abwehr von Eindringlingen wie Viren oder Pathogenen. Oft ähneln Nanopartikel in ihrer Form, Funktionalisierung und Größe den Viren und Pathogenen [18]. Deshalb stellt der zielgerichtete Aufnahme in T-Zellen ganz besondere Ansprüche an die Nanopartikel in Bezug auf Art, Beschaffenheit und Größe [19].

1.1.1. Nanodimensionale Trägersysteme als Wirkstofftransportsysteme

Das höchste Ziel bei der Applikation von Nanopartikeln ist der zielgerichtete und spezifische Transport von Wirkstoffen in Zellen [20]. Nanodimensionale Trägersysteme mit optimierten physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften werden von Zellen leichter aufgenommen als große Moleküle. Somit eignen sie sich als Trägersystem für bioaktive Substanzen [21]. Liposomen, Dendrimere, metallische/magnetische und peptidbasierende Nanopartikel sind Beispiele von Systemen, die potenziell als Wirkstofftransportsysteme eingesetzt werden [22]. In Abbildung 1 sind die Beispiele für nanodimensionale Trägersysteme gezeigt.

Die Idee, mittels zielgerichteter nanodimensionaler Therapie, Tumorwachstum einzudämmen ohne dabei den Körper kollateral zu schädigen gewinnt zunehmend an Interesse, sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie. Dabei spielen vor allem Nanopartikel auf der Basis von biokompatiblen Materialien eine besondere Rolle [20].

Für die biologische Anwendung bietet sich eine Einteilung der nanodimensionalen Trägersystemen nach ihrer Funktion an, so eignen sich besonders Liposomen, Micellen oder Nanokapseln zum Transport von hydrophilen oder hydrophoben Substanzen, während peptidbasierende Nanopartikel und Blockcopolymere sich für den

1. Einleitung

Transport von DNA oder siRNA eignen. Bei den Liposomen, Micellen oder Nanokapseln wird optimalerweise der Wirkstoff im Inneren eingeschlossen und von dem Nanomaterial umgeben [23].

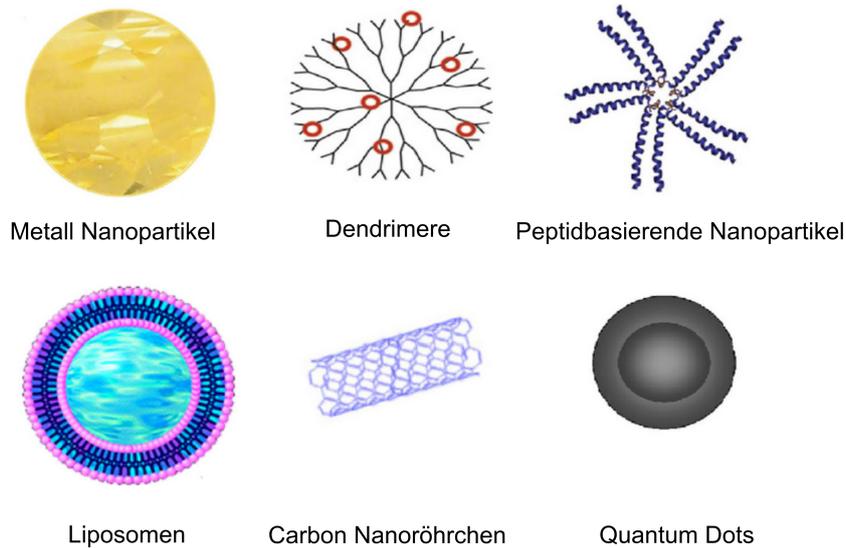


Abbildung 1: Beispiele für nanodimensionale Trägersysteme, die als Wirkstofftransportsystem eingesetzt werden. Abbildung modifiziert nach [20]. ©A. Mirza und F. Siddiqui.

Bei den peptidbasierenden Nanopartikeln und Blockcopolymeren entsteht über elektrostatische Wechselwirkungen ein Komplex aus Wirkstoff/Substanz und Nanomaterial. Da sowohl peptidbasierende als auch Blockcopolymer eine kationische Teillaugung besitzen, während siRNA anionisch geladen ist. In Abbildung 2 ist beispielhaft die Komplexbildung von siRNA mittels kationischen Blockcopolymeren dargestellt. Die Verpackung von siRNA ist notwendig, da weder DNA- noch RNA-Moleküle über die Zellmembran aufgenommen werden. Deshalb wurden *in vitro* Methoden, wie virale Transduktion, Calcium-Phosphat-Transfektion, Elektroporation oder Nucleofektion, etabliert, um DNA oder RNA ins Zytoplasma einer Zelle zu transportieren [24, 25]. Um auch *in vivo* DNA und RNA zu applizieren, sind andere Methoden notwendig. So werden Trägersysteme entwickelt, die DNA oder RNA komplexieren können und so nanodimensionale Partikel entstehen, die die Zellmembran durchwandern können [26, 27]. Die Transfektion von RNA oder DNA hat sich zu einem

wichtigen Werkzeug in der Behandlung von Krebs und Autoimmunerkrankungen entwickelt. So kann über kurze inhibitorische RNA (engl. *short interfering RNA*, siRNA) Sequenzen gezielt die Expression von Proteinen herunter reguliert werden, die bspw. als Onkogene oder als proinflammatorisch bekannt sind [28, 23].

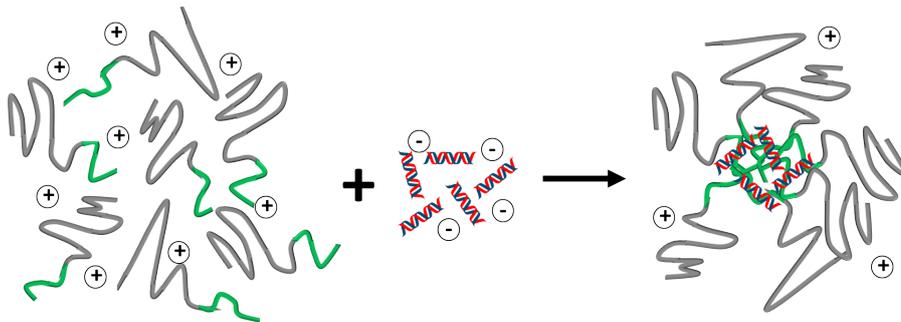


Abbildung 2: Beispiele für die Komplexbildung von siRNA über elektrostatische Wechselwirkungen des kationischen Nanomaterials und der anionischen siRNA. Als kationisches Nanomaterial ist schematisch ein Blockcopolymer dargestellt. Die Blockcopolymere verfügen über eine kationische Ladung, welche nach der Komplexbildung mit der anionischen siRNA teilweise noch erhalten bleibt.

In dieser Arbeit wurden zwei Blockcopolymersysteme und ein Kapselsystem zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen verwendet. Blockcopolymere eignen sich als Wirkstoff-trägersysteme besonders, da über die unterschiedlichen Blöcke verschiedene chemische Eigenschaften vereint werden [29, 30]. Ein besonderer Vorteil der Blockcopolymere, die verwendet wurden, ist die geringe Größe, kationische Ladung und Fähigkeit siRNA zu komplexieren [31, 32].

Kapselsysteme besitzen den Vorteil, dass sie hydrophile oder hydrophobe Substanzen einschließen und in die Zelle transportieren können [33]. Weiterhin lässt sich durch eine Vielzahl an Funktionalisierungen die Aufnahme in Zellen verbessern [15, 17].

1.2. Intrazelluläre Aufnahmemechanismen

Zur Aufnahme von Partikeln und Flüssigkeiten aus dem extrazellulären Raum nutzen Zellen Aufnahmemechanismen, die als Endozytose bezeichnet werden. Denn

1. Einleitung

die Zellmembran ist nur für sehr kleine Moleküle durchlässig. Die Endozytose wurde zum allerersten Mal von Christian de Duve im Jahre 1974 erwähnt [34]. Darunter versteht man eine Vielzahl an aktiven Aufnahmemechanismen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Zellmembran Einstülpungen bildet, in denen sich die extrazellulären Substanzen befinden. Nachfolgend entstehen aus den Einstülpungen Transportvesikel, die von Zellmembran umgeben sind und die extrazellulären Substanzen beinhalten [35]. Die endozytotischen Aufnahmewege lassen sich bezüglich der Größe der Vesikel, die Art der aufgenommenen Substanzen (Liganden, Rezeptoren, Lipide, nanodimensionale Trägersysteme), und Mechanismen der Vesikelformation unterscheiden [36]. Die Subtypen der Endozytose sind die Phagozytose und unterschiedliche pinozytotischen Aufnahmemechanismen. Nach erfolgreicher Internalisierung verschmelzen die Vesikel zu frühen und späten Endosomen und letztlich zu Lysosomen.

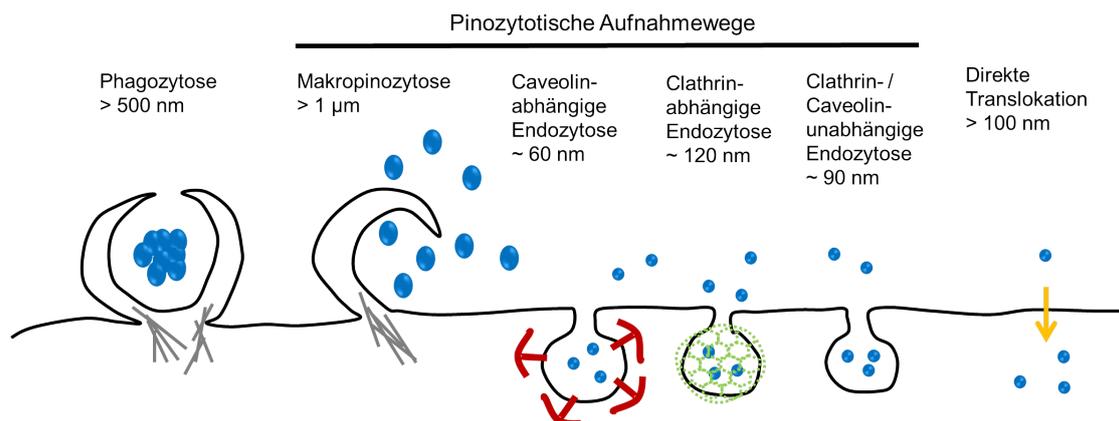


Abbildung 3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen endozytotischen Aufnahmemechanismen. Die Aufnahmewege unterscheiden sich bezüglich Größe der Vesikel, Art der aufzunehmenden Substanzen und Mechanismus der Vesikelformation. Abbildung modifiziert nach [36, 37, 35].

Phagozytose

Die Phagozytose wird primär von spezialisierten Zellen ausgeübt, deren Funktion die Entfernung von großen Pathogenen und Zelldebris ist. Dazu zählen vor allem Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) und Neutrophile [38]. Dieser stark regulierte Prozess involviert spezifische Ober-

flächenrezeptoren und Signalkaskaden, die durch GTPasen der Rho-Familie reguliert sind, und können durch Phagozytose Partikel, die größer als 750 nm sind, aufgenommen werden [39]. Dieser Mechanismus kann genutzt werden, um DCs mit Antigen/Peptid-modifizierten nanodimensionalen Trägersystemen zu beladen, die wiederum an T-Zellen präsentieren und diese aktivieren. Hierbei handelt es sich um eine effektive und vielversprechende Methode, die im Zusammenhang mit der Entwicklung von neuartigen Krebstherapien, erforscht wird [40].

Makropinozytose

Die klassische Makropinozytose ist Clathrin-, Caveolin-unabhängig und tritt spontan auf oder kann über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden. Während der Makropinozytose werden große Volumina an Flüssigkeit, Partikeln oder Agglomeraten mittels Makropinosomen internalisiert [41]. Dafür bildet die Zellmembran die typische Ausstülpung, die extrazellulären Substanzen umgibt und einschließt [42]. Die Makropinozytose unterscheidet sich von der Phagozytose durch die unspezifische Aufnahme von Partikeln und Flüssigkeit, es ist keine spezifische Rezeptor Interaktion vorhanden [43]. Charakterisiert werden, kann die Makropinozytose über die Aufnahme von den Flüssigphasenmarkern Dextran und HRP [44]. Teilweise kann die Makropinozytose über Wachstumsfaktoren stimuliert werden [36]. Oft wird die Makropinozytose in den Zusammenhang mit der Antigeninternalisierung und -präsentation gebracht, aber auch mit dem Eintritt von Viren in die Zellen [43, 42]. Das wiederum führte zu der Überlegung, ob kationische zellpenetrierende Peptide (engl. *cell penetrating peptides*, CPPs), die in ihrer Struktur Viren sehr ähnlich sein können, über Makropinozytose aufgenommen werden [45].

Endozytose

Die Endozytose lässt sich in unterschiedliche pinozytotische Aufnahmewege unterteilen. Dabei wird zwischen der Clathrin-abhängigen sowie Caveolin-abhängigen Endozytose und Clathrin- /Caveolin-unabhängigen Endozytose unterschieden. Die Proteine Clathrin und Caveolin spielen bei diesen Aufnahmewege eine essentielle Rolle. Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose, welches als die klassische Aufnahmeroute bezeichnet wird, formatiert sich das Protein in der Zellmembran

und es entstehen Clathrin beschichtete Membrangruben und -vesikel [46]. Der Aufnahmeweg ist klassisch für die Aufnahme von Nährstoffen, wie Cholesterin, Lipide oder Transferrin via Transferrin-Rezeptor. Deshalb eignet sich die Co-Aufnahme von Transferrin auch für den Nachweis der Clathrin-abhängigen Endozytose [47].

Caveoline sind membranständige Proteine, die beteiligt an der Rezeptor-unabhängigen Endozytose und Bestandteile von 'Lipid Rafts' sind [47]. Weiterhin ist Caveolin häufig im Muskel, Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten vorhanden, jedoch nicht in Neuronen und Leukozyten [35]. Der Aufnahmeprozess ist langsamer als bei der Clathrin-abhängigen Endozytose und wird als wichtig bei der Aufnahme von Proteinen und DNA vermutet [48].

Zusätzlich kann über Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose eine Zellaufnahme erfolgen. Hierbei handelt es sich um heterogene Prozesse mit heterogenen Zielsubstanzen, wie Wachstumsfaktoren, Interleukinen und unterschiedlichen Proteinen, die aufgenommen werden [47]. Weiterhin konnten für Folat-modifizierte Nanomaterialien eine Aufnahme über die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose nachgewiesen werden [49].

Die Endozytose ist ein heterogener Aufnahmeweg bei dem unterschiedliche Proteine beteiligt sind und die Aufnahme vieler unterschiedlicher Substanzen in Zellen ermöglicht.

Direkte Translokation

Eine nicht-endozytotische Möglichkeit zur Aufnahme stellt die direkte Translokation dar. Hierbei durchwandern die hauptsächlich kationischen Substanzen die Zellmembran ohne jegliche Beteiligung von Rezeptoren, Poren, Kanäle oder andere Aufnahmemechanismen [50, 51]. Es ist auch schon seit längerem bekannt, dass Nanopartikel über diese unspezifische Translokation in Zellen aufgenommen werden [19]. Die direkte Penetration über die Zellmembran wurde erstmals im Zusammenhang mit *cell penetrating peptides* (CPP) erwähnt. Hierbei handelt es sich um kationische Peptide, die die Zellmembran unspezifisch penetrieren können und somit in die Zelle gelangen [52, 53]. Es wird vermutet, dass die Peptide durch ihre kationische Ladung in Interaktion mit den anionischen Phospholipiden der Zellmembran treten können, diese destabilisieren und somit direkt durch die Membran migrieren [54, 55, 56]. Eine weitere Möglichkeit ist durch die Formation von inversen Micellen,

die 1996 zuerst im Zusammenhang mit der Translokation des Proteins Penetratin erwähnt wurden [57]. Dabei kommt es auch zur Destabilisierung der Phospholipid-Doppelmembran und über elektrostatische Wechselwirkungen zur Micellenformation, die die CPPs umschließen [54]. Weiterhin wird diskutiert, ob die Akkumulation von CPPs an der Membranoberfläche durch Wechselwirkungen nachfolgend Poren bilden können, die das Eindringen der CPPs möglich macht [58, 59, 60, 61]. Unabhängig davon, werden noch die Elektroporations-ähnliche Permeabilisierung der Zellmembran oder das Eindringen an den Grenzen zu Mikrodomänen, als mögliche Mechanismen der direkten Translokation diskutiert [54, 55, 56].

Dieser Möglichkeit der Aufnahme gewährleistet einen zuverlässigen Transport von kationischen Nanomaterialien über die Zellmembran bei Zellen, die keine hohen Endozytoseraten aufweisen. Weiterhin stellen kationische Nanomaterialien ein sehr gutes Trägersystem für anionische Wirksubstanzen, wie DNA und RNA, dar [26, 50].

Endosomen

Nanopartikel und extrazelluläre Substanzen können unterschiedliche Wege nutzen, um in Zellen aufgenommen zu werden. Nach der Internalisierung werden die Partikel in endozytotischen Vesikel durch die Zelle transportiert und eventuell in Lysosomen abgebaut oder über die Exozytose wieder aus der Zelle ausgeschleust [35, 36]. Die Vesikel verändern sich in ihrer Zusammensetzung während dem Transport durch die Zellen. So werden Vesikel direkt nach der Aufnahme als frühe Endosomen (engl. *early endosomes*, EE), die zu späten Endosomen (engl. *late endosomes*, LE) reifen und schließlich mit Lysosomen verschmelzen können, bezeichnet [62, 63]. Die unterschiedlichen Stadien sind charakterisiert durch spezifische Marker. So können klassische frühe Endosomen durch die Proteine EEA1 und Rab5 identifiziert werden [63].

Aus späten Endosomen können auch multivesikuläre Vesikel entstehen, die sich u.a. aus Rab5⁺ frühen Endosomen bilden und beteiligt an der Exozytose sind [64]. Zur Identifikation von späten Endosomen müssen unterschiedliche Marker herangezogen werden, da es den einen spezifischen Marker nicht gibt. Die Detektion erfolgt über Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR), Lamp1/Lamp2, Rab5, Rab7 und verschiedene Tetraspanine. Dabei sind vor allem die Tetraspanine CD82, CD9, CD81 und CD63 zu nennen. [64, 65].

Lysosomen

Lysosomen sind die terminalen Vesikel innerhalb der endozytotischen und autophagozytotischen Wegen [63, 66]. Somit sind die Vesikel die letzte Destination für eine Vielzahl an Substanzen und sind an der Regulierung unterschiedlicher Prozesse, wie Herunterregulation von Oberflächenrezeptoren, Inaktivierung von Pathogenen oder Abbau von Stoffwechselprodukten [66]. Charakteristisch für Lysosomen ist der saure pH-Wert von 4,6 bis 5, welcher das optimale Milieu für eine Vielzahl von Hydrolasen darstellt [67]. Dazu zählen Proteasen, Lipasen, Glucosidasen, Nukleasen, Phosphatasen und Lysozym [66]. Das Vorhandensein des sauren pH-Werts und unzähliger Enzyme kann genutzt werden für die Wirkstofffreisetzung aus Nanopartikeln. So kann entweder ein enzymatischer Abbau des Nanopartikel oder ein Anionenaustausch erfolgen und den Wirkstoff freisetzen [68]. Weiterhin kann das saure Milieu zur Markierung von Lysosomen genutzt werden, da es keine bewährten lysosomale Marker gibt. Zwar sind lysosomale Enzyme durch einen Mannose-6-Phosphat-Rest gekennzeichnet, dieser ist jedoch nicht für Lysosomen spezifisch, da er auch in späten Endosomen vorhanden ist [64, 69]. Auch über Endozytose aufgenommene Nanopartikel gelangen nach einer gewissen Zeit ins Lysosomen.

1.3. Periphere mononukleäre Blutzellen

Die Zellen des Blutes lassen sich unterteilen in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Der zelluläre Anteil des Blutes liegt bei 40 bis 45%, der restliche Teil ist bestehend aus Plasma, welches Wasser, Proteine, Elektrolyte und Nährstoffe enthält. Aus chemisch-physikalischer Sicht handelt es sich bei Blut um eine Suspension bestehend aus Wasser und zellulären Bestandteilen. Der pH-Wert des Blutes liegt bei 7,4 und wird über unterschiedliche Puffersysteme konstant gehalten [70].

Die Blutzellen lassen sich weiter unterteilen in periphere mononukleäre Zellen (engl. *periphere blood mononuclear cells*, PBMCs), die alle runde, einkernige Zellkerne besitzen. Dazu zählen T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [71, 72]. In Abbildung 4 sind die Zellen des Blutes dargestellt.

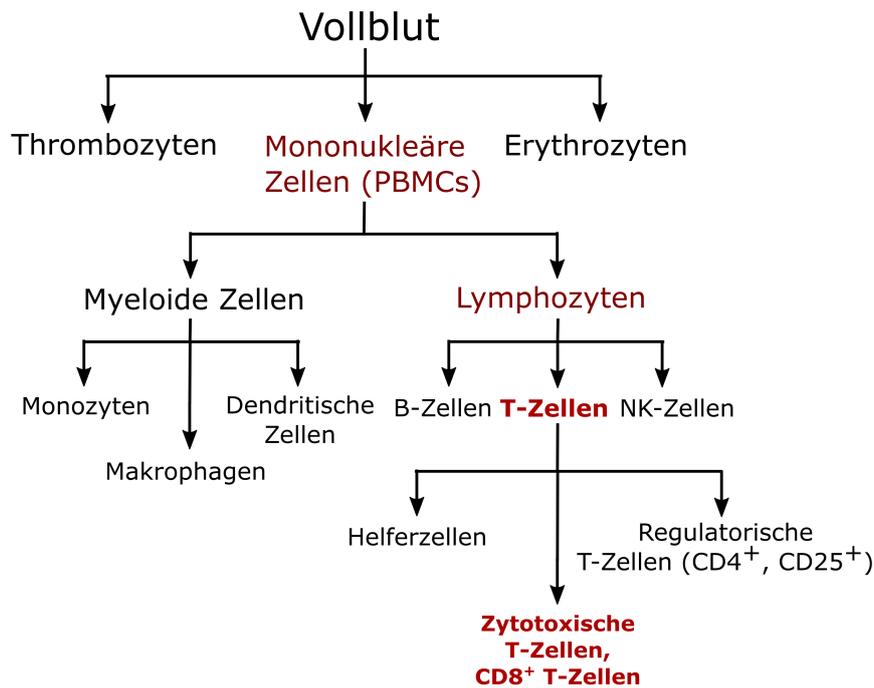


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellen des Blutes. Zytotoxische T-Zellen werden auch als CD8⁺ T-Zellen bezeichnet, gehören zu den Lymphozyten, welche wiederum zu der Gruppe der peripheren mononukleären Blutzellen (engl. Periphere Blood Mononuclear Cell, PBMCs) gehören. Die PBMCs bezeichnet Blutzellen, die einen einzigen großen, runden Zellkern besitzen. Abbildung modifiziert nach [71, 72].

Mittels Dichtegradientenzentrifugation lassen sich PBMCs von den restlichen Blutzellen und Blutplasma trennen [73, 72]. Dafür wird ein hydrophiles Kolloid (Separationsmedium), welches aus Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer besteht und als Ficoll oder Histopaque[®] bezeichnet wird, verwendet. Das Separationsmedium separiert Vollblut in zwei Fraktionen, die unter und über der Dichte von 1,077 g/ml liegen. Die PBMCs besitzen eine geringere Dichte und liegen deshalb als Ring auf dem Separationsmedium. Dieser Ring wird auch als 'Buffy-Coat' (lederfarbene) Schicht bezeichnet und beinhaltet alle mononukleären Zellen. Unter dem Separationsmedium befinden sich die Erythrozyten und polymorphokernige Leukozyten (Granulozyten), weil sie eine höhere Dichte als 1,077 g/ml besitzen. In Abbildung 5 sind die Schichten vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation dargestellt. Die Buffy-Coat-Schicht beinhaltet Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen), Monozyten und unreife den-

1. Einleitung

ditische Zellen (engl. *immature dendritic cells*, iDCs) (siehe Abbildung 4) [74]. Der Anteil dieser Zellen variiert sehr unter den Individuen. In der Regel sind 70 bis 90% der Lymphozyten PBMCs, davon sind ca. 5% Monozyten, während die dendritischen Zellen lediglich 1 bis 2% der PBMCs ausmachen. Der Anteil an CD3⁺ T-Zellen unter den Lymphozyten beträgt 70 bis 85%, das entspricht ungefähr 45 bis 70% der PBMCs. Die CD3⁺ Fraktion lässt sich nochmals unterteilen in CD4⁺ (25-60 % der PBMCs) und CD8⁺ T-Zellen (5-30 % der PBMCs) [75, 72]. Die CD4⁺ T-Zellen sind bekannt als T-Helferzellen (T_H Zellen) und regulatorische T-Zellen (T_{Reg} Zellen). Die CD8⁺ T-Zellen wiederum werden als zytotoxischen T-Zellen bezeichnet und sind sehr heterogen in der Markerexpression und umfassen an die 200 funktionelle Phenotypen [72]. In dieser Arbeit werden CD8⁺ T-Zellen als Zielzellen verwendet.

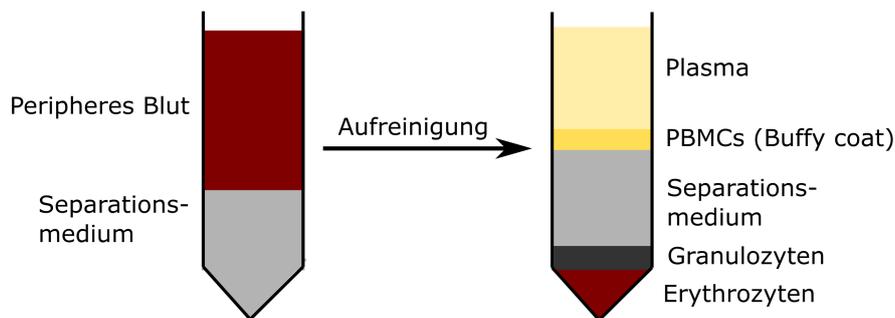


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Buffy-Coat Aufreinigung mittels Separationsmedium und Dichtegradientenzentrifugation. Abbildung modifiziert nach [76].

1.4. CD8⁺ T-Zellen und ihre Funktion

Da diese Doktorarbeit auf Arbeiten mit zytotoxischen T-Zellen basiert, soll in diesem Abschnitt die Funktionen und Aufgaben der CD8⁺ T-Zellen genauer erläutert werden.

Wie in Abschnitt 1.3 erläutert sind CD8⁺ T-Zellen Teil der Blutzellen und werden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender MACS-Aufreinigung isoliert.

Bei den zytotoxischen T-Zellen handelt es sich um Immunzellen, die ihren Ursprung

im Rückenmark haben und im Thymus reifen. Während der Reifung bilden die T-Zellen entweder einen CD4⁺ oder CD8⁺ Rezeptor (engl. *T-cell receptor*, TCR) aus, selten bilden die T-Zellen auch beide Rezeptoren aus und werden als doppelpositive T-Zellen bezeichnet [77]. Jedoch kann grundsätzlich über diese Oberflächenrezeptoren zwischen T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) unterschieden werden. Trotzdem werden reife T-Zellen bis zum ersten Antigen-Kontakt als naive T-Zellen bezeichnet. Solange überwachen die CD8⁺ T-Zellen die Körperzellen und nach dem Eindringen von Pathogenen, virusinfizierten Körperzellen oder Krebszellen werden die CD8⁺ T-Zellen aktiviert und eliminieren ihre Zielzellen [78].

TCR vermittelte Erkennung von Zielzellen

Zinknagel konnte 1996 zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen nur virusinfizierte Zellen erkennen können, wenn diese bestimmte MHC-Moleküle (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) exprimieren [79]. Die TCR vermittelte Erkennung von Peptid-Antigenen, die über einen MHC-Rezeptor präsentiert werden, spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Immunantwort. Der TCR bindet über die variable Domäne an den MHC-Komplex, der von Antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) exprimiert wird [80]. Ein einzelner TCR kann unterschiedliche Peptid/MHC Liganden erkennen. Dabei wird zwischen agonistischen und antagonistischen (inhibitorischen, hemmenden) Liganden unterschieden. Beide Liganden führen zu einer Initiierung der Signaltransduktion, jedoch mit gegensätzlicher Antwort. Während Agonisten zu einer Aktivierung der Immunantwort führen, hemmen antagonistische Liganden die Immunantwort der T-Zelle [78]. Weiterhin muss beachtet werden, dass bei der TCR vermittelten Erkennung immer weitere Co-Rezeptoren beteiligt sind. Das bedeutet, wenn der TCR an den MHC-Komplex von APCs bindet, bildet sich eine immunologische Synapse aus, an der weitere Co-Rezeptoren beteiligt sind. In Abbildung 7 sind die wichtigsten Co-Rezeptoren und Liganden dargestellt. Über diese Zell-Zell-Kontakte können die T-Zellen mit weiteren Immunzellen kommunizieren. Weiterhin kann die immunologische Synapse genutzt werden, um ein Anheften der Immunzellen an infizierte Zellen oder Krebszellen zu ermöglichen [81].

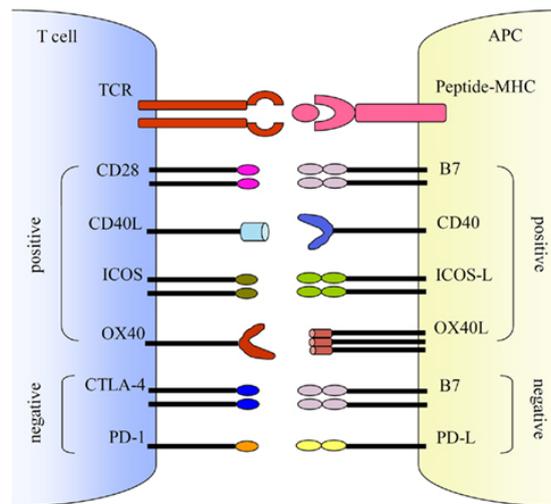


Abbildung 6: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse, die sich zwischen CD8⁺ T-Zellen (T cell) und Antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausbilden kann. Bei der Aktivierung von T-Zellen sind immer Co-Rezeptoren beteiligt, die entweder zu einem positiven (Aktivierung der T-Zelle) oder zu einem negativen intrazellulärem Signal (T-Zelle wird gehemmt) führt. Die bekanntesten inhibitorischen Rezeptoren sind CTLA-4 und PD-1. Für die Feinregulation der Immunantwort über T-Zellen sind immer positive und negative Signale notwendig. Sobald jedoch inhibitorische Rezeptoren verstärkt exprimiert werden, ist das ein Hinweis auf die Erschöpfung der T-Zelle [82]. ©X. Huand und Y. Yang.

Co-stimulierende Rezeptoren und Signale

Die wesentlichen Elemente der zellulären Immunantwort sind die Aktivierung, klonale Expansion und Differenzierung in T-Zell-Subpopulationen. So kann die Aktivierung von T-Zellen in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase werden naive T-Zellen aktiviert, die anschließend in Effektorzellen differenzieren. In der zweiten Phase erkennen die Effektorzellen spezifische Antigene und eliminieren die Zielzellen. Die Co-Rezeptoren wiederum übernehmen die Feinregulierung der T-Zell-Immunantwort [78]. So benötigen die Effektorzellen drei Signale zur Aktivierung: 1) TCR-Aktivierung, 2) Co-stimulierender Rezeptor CD28-B7 wird aktiviert und 3) IL-2 vermitteltes Signal. Dieses Signal ist bei naiven T-Zelle nicht notwendig, da diese keinen IL-2-Rezeptor exprimieren. Das am besten charakterisierte Signal ist die Aktivierung von naiven T-Zellen basierend auf der Interaktion von B7 mit CD28 und dem Antigen CTLA-4. Dabei stellt die B7-CD28-Interaktion das agonistische Signal dar, während CTLA-4 die T-Zellantwort hemmen soll [83]. Da CD28 immer auf der T-Zellen exprimiert ist, wird CTLA-4 sehr schnell nach der Aktivie-

ung hochreguliert, um so eine überschießende Immunreaktion zu verhindern [78]. Zusammengefasst ist die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen ein Resultat aus der Bindung des TCR an ein Antigen und die Beteiligung von vielen unterschiedlichen Co-stimulierende Rezeptoren auf den T-Zellen und Signalen die von APCs und T-Helferzellen generiert werden. So ist die Effektivität der Aktivierung abhängig vom TCR-Signal und das der Co-stimulierenden Faktoren [78].

Zytotoxische Funktion der T-Zellen

Es gibt drei mögliche Wege, wie T-Zellen ihre Zielzellen eliminieren können. Zwei dieser Wege gehen über einen direkten Zell-Zell-Kontakt, während der dritte über die Ausschüttung von Zytokinen, wie TNF-alpha oder INF-gamma statt findet [78]. Die Zytokine werden solange produziert, wie die TCR Stimulierung andauert. TNF-alpha Ausschüttung bewirkt die Aktivierung der Caspase-Kaskade und führt somit zur Apoptose der Zielzelle. INF-gamma führt zur Induktion des Fas-vermittelten zellulären Lyse.

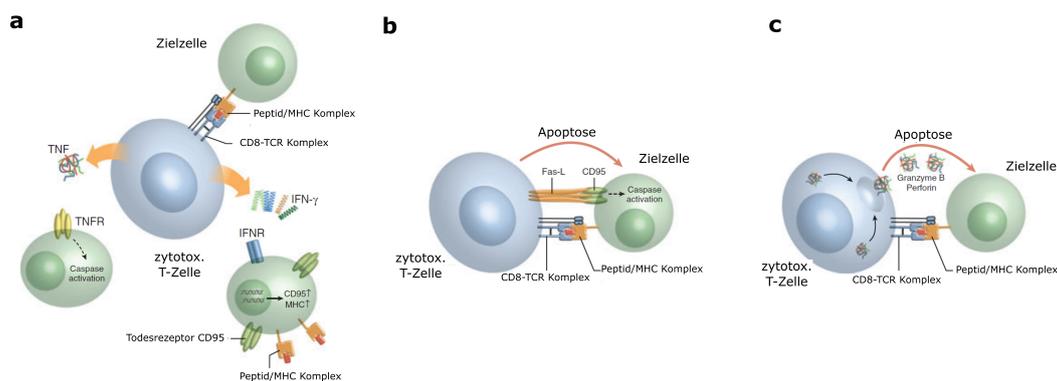


Abbildung 7: Zytotoxische Funktion der T-Zellen kann über drei Wege vermittelt werden. a) Indirekte Eliminierung der Zielzellen über die Ausschüttung von TNF-alpha und IFN-gamma. b) Induktion der Apoptose über Aktivierung der Todesrezeptoren (CD95). c) Direkte Eliminierung durch die Ausschüttung von Granzyme B und Perforin in den interzellulären Raum von T-Zelle und Zielzelle [78]. Copyright(2016) mit Erlaubnis von Elsevier.

Die letzte Möglichkeit ist über die Freisetzung von Perforin und Granzym in den interzellulären Raum, nachdem der TCR an die Zielzelle gebunden hat [78, 84]. Die beiden Proteine sind hoch zytotoxisch. Um sich selbst vor den Substanzen zu

schützen nutzen die T-Zellen zwei Funktionen. Zum einen werden die Vorstufen der beiden zytotoxischen Proteine in Lysosomen gespeichert, die nach Aktivierung an die Oberfläche treten und ihren Inhalt frei geben [78, 85]. Weiterhin treten die Lysosomen nur dort an die Oberfläche, wo ein Kontakt zur Zielzelle besteht und die Zelle schützt somit sich selbst und die weitere Umgebung vor den zytotoxischen Zytokinen. Die zytotoxischen Enzyme sind nur nach Aufnahme in die Zielzelle tödlich [78, 86].

Zytotoxische T-Zellen und Krebserkrankungen

Die Funktion von zytotoxischen T-Zellen bei Tumorerkrankungen wird mit zunehmendem Interesse erforscht, da zytotoxische T-Zellen aufgrund ihrer Funktionen (wie oben beschrieben) ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung von Tumoren darstellen.

So konnte auch recht schnell festgestellt werden, dass Krebszellen die Fähigkeit besitzen zytotoxische T-Zellen in ihrer Umgebung zu inaktivieren, denn grundsätzlich besitzen zytotoxische T-Zellen auch in Kombination mit regulatorischen T-Zellen die Fähigkeit Tumorzellen zu eliminieren [87]. Deshalb nimmt die Relevanz zu, effektive antitumorale zytotoxische Immunantworten mittels T-Zellen zu generieren. Dabei wird vor allem die Manipulation oder Modulation der T-Zellen gegenüber den Tumorzellen in Bezug auf die hemmende Rezeptoren in Fokus genommen [78]. Die Funktion von hemmenden Rezeptoren wird in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

In der klinischen Forschung wird die Manipulation der T-Zellen auch als immunologische Checkpoint-Blockade bezeichnet. Und das bedeutet, dass negative Signale, die die T-Zellfunktion blockieren eliminiert werden [88, 89, 90]. In der klinischen Phase sind bereits PD-1 und CTLA-4, die mittels Antikörper blockiert werden, mit dem Hauptziel den Zustand der T-Zell-Erschöpfung rückgängig zu machen [88, 90].

T-Zell Erschöpfung

Die T-Zell Erschöpfung wurde vor mehreren Jahrzehnten als Dysfunktion von Antigen-spezifischen T-Zellen während und nach chronisch viralen Infektionen in Mäusen beschrieben [91, 92]. Von diesem Zeitpunkt an, konnte in vielen Studien die

Erschöpfung der T-Zellen während chronischen Infektionen und Krebserkrankungen nachgewiesen werden [93].

Erschöpfte T-Zellen verlieren ihre Effektorfunktion, exprimieren unterschiedliche inhibitorische Rezeptoren und besitzen eine veränderte Transkription. Die T-Zell Erschöpfung geht oft einher mit ineffizienter Kontrolle von persistierenden Infektionen und Tumore, jedoch kann die Reaktivierung der T-Zellen zu einer wieder funktionierender Effektorfunktion führen [93, 94]. Naive T-Zellen werden durch Infektionen oder Impfungen aktiviert und differenzieren in Effektorzellen innerhalb von ein bis zwei Wochen. Dieser Prozess ist begleitet von Proliferation, transkriptionaler Reprogrammierung, Expansion und Erlangung von Effektorfunktionen [95]. Nach dem Höhepunkt der Entzündung, sterben die meisten aktivierten T-Zellen und lediglich eine kleine Population verwandelt sich in Gedächtniszellen (engl. *memory cells*). Diese Gedächtniszellen sind hauptsächlich inaktiv, besitzen jedoch die Fähigkeit sehr schnell ihre Effektorfunktion zu reaktivieren, wenn sie stimuliert werden [95]. Bei einer chronischen Entzündung und Krebserkrankungen, was eine permanente Antigen Belastung und/oder Entzündung bedeutet, wird die Gedächtniszellfunktion negativ beeinflusst. So wurde beobachtet, dass es zu einem fortschreitenden Verlust der Effektorfunktion und eine zunehmende Expression von inhibitorischen Rezeptoren kommt [93]. Die Erschöpfung von humanen T-Zellen wurde zum ersten mal im Zusammenhang mit chronischen viralen Infektionen (HIV, Hepatitis C) und bei Krebserkrankungen beschrieben [93, 96]. Die Erschöpfung der T-Zellen verhindert eine optimale Kontrolle der Immunfunktion während Infektionen und Krebserkrankungen. Dabei wurden zwei Proteine entdeckt, die während der Erschöpfung überexprimiert sind. Es handelt sich dabei, um PD-1 (engl. *programmed cell death 1*, PD-1) und CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*, CTLA-4). Wie oben schon erwähnt führt die gezielte Hemmung der Proteine zu einer Reaktivierung der Effektorfunktion [93, 96]. So wurde die Manipulation der T-Zellen zu einem wichtigen Instrument, um mittels eigener Immunzellen chronische Entzündungen und Krebserkrankungen zu behandeln [94]. In Tabelle 2 sind die wesentlichen Unterschiede zwischen funktionierenden Gedächtniszellen/Effektorzellen und erschöpften T-Zellen dargestellt.

1. Einleitung

Tabelle 2: Veränderung der T-Zell-Funktion durch chronische Entzündung und Krebserkrankungen. Die chronische Antigenpräsenz führt zu einer Veränderung der Funktion von Gedächtniszellen und wirkt sich negativ auf die Effektorfunktion der T-Zellen aus. Die Tabelle ist modifiziert nach [93, 94].

Eigenschaft	Aktive Gedächtniszelle	Erschöpfte T-Zelle
Proliferationspotential	+++	+/-
Produktion Zytokine	+++	+/-
Inhibitorische Rezeptoren (PD-1, CTLA-4, 2B4)	-	+++

Was T-Zell Erschöpfung verursacht, ist eine der zentralen Fragen, die viele Wissenschaftler beschäftigt. Es ist sicherlich ein Zusammenspiel aus der direkten Umgebung, inhibitorischen Signale von anderen Lymphozyten, inhibitorischen Zytokine sowie die Expression von inhibitorischen Rezeptoren [94]. Jedoch scheint das permanente oder chronische Einwirken der Antigene auf die T-Zellen eine Schlüsselrolle zu spielen. Zusätzliche Faktoren, wie das Fehlen von T-Helferzellen und die Expression von inhibitorischen Rezeptoren tragen vermutlich dazu bei [97, 93]. So konnte in früheren Studien schon gezeigt werden, anhand dem chronischen Lymphozytäre Choriomeningitis Virus Mausmodell (engl. *lymphocytic choriomeningitis virus*, LCMV), dass das Level der Erschöpfung von der Stärke der Antigen-Einwirkung abhängig ist [98]. Tatsächlich zeigte sich auch, wenn T-Zellen den Virusantigenen zeitlich begrenzt ausgesetzt werden, bilden sie ihre normale Effektor- und Gedächtnisfunktion aus [99, 100]. Bleibt die Antigen-Einwirkung jedoch bestehen so etabliert sich das Erschöpfungsstadium der T-Zellen und sie entwickeln sich nicht zu Gedächtniszellen weiter.

Somit tragen hemmende Rezeptoren einen entscheidenden Teil zur T-Zell Erschöpfung bei. Grundsätzlich führt die Aktivierung von inhibitorischen Rezeptoren zu einer Aktivierung von hemmenden Stoffwechselwegen, die wesentlich in der Kontrolle von Autoreaktivität und überschießender Immunantworten sind [78, 94, 101]. So ist die Expression von inhibitorischen Rezeptoren ein normaler Vorgang nach Aktivierung der T-Zellen, jedoch ist deren erhöhte bzw. starke Expression ein Marker für den Erschöpfungsstatus der T-Zellen. Weiterhin wird dieser Mechanismus von Krebszellen genutzt, da diese fähig sind inhibitorische Liganden zu exprimieren [94]. Die Effektorfunktion wird eingeschränkt, weil die Aktivierung der inhibitorischen Rezeptoren

ren zur Aktivierung von hemmenden Signalkaskaden und Genen führt. Jedoch sind die Signalwege weder für PD-1 noch für CTLA-4 komplett verstanden [93, 94, 101]. Die Expression von PD-1 wird schnell nach Aktivierung der T-Zelle hochreguliert und kann während einer chronischen Infektion auf einem erhöhtem Niveau bleiben. Jedoch ist die alleinige Hochregulierung von PD-1 kein Hinweis auf die Erschöpfung der T-Zellen. Vielmehr können neben PD-1 noch weitere hemmende Rezeptoren exprimiert werden, wie 2B4, CTLA-4 und TIM3. Und das Zusammenspiel der unterschiedlich inhibitorischen Rezeptoren zeigt die Schwere der Erschöpfung an [94]. So konnte mit der Blockade von PD-1 und CTLA-4 in Melanom-Patienten eine gute Kontrolle des Tumorwachstums gezeigt werden [102, 90]. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die inhibitorischen Rezeptoren eine wichtige Funktion bei der Verhinderung von überschüssigen Immunreaktionen haben, so könnte die komplette Hemmung der Rezeptoren zu ungewünschten Nebeneffekten wie Autoreaktivität des Immunsystems führen. Folglich kann die Manipulation von unterschiedlichen Rezeptoren, in unterschiedlicher Stärken effektiver sein, als die Hemmung eines inhibitorischen Rezeptors.

Neben Rezeptoren bietet die Manipulation von löslichen Faktoren, wie spezifische Interleukine oder Zytokine, oder regulatorische T-Zellen ein weiterer Ansatzpunkte bei Regulierung der T-Zellfunktion [94].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zytotoxische T-Zellen grundsätzlich die Funktion besitzen Krebszellen zu erkennen und diese zu eliminieren. Jedoch lösen Krebszellen eine chronische Entzündung und somit permanente Aktivierung der T-Zellen aus. Das wiederum resultiert in der Expression unterschiedlicher inhibitorischen Rezeptoren, die verhindern, dass Effektorzellen in Gedächtniszellen differenzieren, sondern in einen Erschöpfungszustand übergehen, der sie in ihrer Funktion hemmt. Die Manipulation der T-Zellfunktion über die Hemmung der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Jedoch muss beachtet werden, dass das Immunsystem ein sensibles System ist, das bestimmte hemmende Signale benötigt, um überschießende Immunantworten und Autoreaktivität zu verhindern. Anstatt PD-1 und CTLA-4 systemisch mittels Antikörper zu hemmen, stellt die *ex vivo* Manipulation von tumorreaktiven T-Zellen eine gute Alternative dar, um überschießende Immunantworten und Autoreaktivität zu verhindern. Dafür bietet sich die Manipulation mittels nanodimensionaler Trägersys-

teme an, die bspw. siRNA in CD8⁺ T-Zellen transportieren könnten.

1.5. CD8⁺ T-Zellen und die Aufnahme von Nanopartikeln

Um zielgerichtet Medikamente oder siRNA in Zellen zu transportieren, eignen sich nanodimensionale Trägersysteme. Zum einen, weil Medikamente erst an ihrem Zielort wirken und zum anderen, weil siRNA nicht ohne Hilfe in Zellen aufgenommen wird. Jeder Zelltyp unterscheidet sich in der Aufnahmeeffizienz. Das liegt sowohl an der Endozytoserate und in der Natur der Zellen.

Primäre zytotoxische T-Zellen zählen zu den Zellen, die sich sehr schwer transfizieren lassen [103]. Sie sind bekannt, eine große Herausforderung für die *ex vivo* Transfektion darzustellen und werden deshalb als '*hard to transfect*' bezeichnet [103]. Während konventionelle Lipid/Polymer-basierende Transfektionsmethoden bei adhärennten Zellen sehr gut funktionieren, sind sie meistens ineffektiv bei T-Zellen [104, 105, 106]. Alternative Transfektionsmethoden wie Elektroporation oder virale Vektoren weisen ebenfalls gewisse Nachteile auf, wie niedrige Transfektionseffizienz, schlechte Viabilität und Sicherheitsbedenken, besonders bei der Verwendung von viralen Vektoren [107, 103].

Neue Strategien stellen intelligent designte nanodimensionale Nanomaterialien dar, die Modifikationen besitzen, welche die Aufnahmeeffizienz in T-Zellen erhöhen [103].

Erfolge konnten mit peptidbasierenden Nanopartikeln gezeigt werden, da diese über elektrostatische Wechselwirkungen über die Zellmembran penetrieren können [53, 108, 103]. Eine Herausforderung ist die teilweise geringe siRNA Bindungskapazität, was die Knockdown-Effizienz negativ beeinflussen könnte [109]. Die Verwendung von siRNA, die an Antikörper gekoppelt sind, könnte dazu führen, dass die T-Zellen ungewollt aktiviert werden, besonders bei entzündlichen Erkrankungen wäre das kontraproduktiv [103]. Weiterhin stellen unterschiedlich modifizierte Nanopartikelssysteme eine gute Möglichkeit dar, um T-Zellen zu transfizieren. Hier muss für die klinische Anwendung besonders auf die Biokompatibilität und -abbaubarkeit geachtet werden. Ein Vorteil der Nanopartikelssysteme ist die sehr variable Modifizierbarkeit der Oberfläche, um so eine zielgerichtete Aufnahme in T-Zellen zu erzielen [103].

Ein weiterer Ansatzpunkt sind Aptamere zum Transport von siRNA oder DNA in T-Zellen. Jedoch ist die Auswahl und Charakterisierung der Aptamere für eine zielgerichtete Aufnahme ein extrem zeitaufwendiger Prozess. Weiterhin steckt die Aptamer-Forschung noch größtenteils in den Kinderschuhen bezüglich Stabilität, Toxizität und Immunogenizität [103].

Da wie oben beschrieben, T-Zellen sehr schwer transfizierbar sind, wird teilweise die Methode verfolgt, dass die Nanoträgersysteme nicht von T-Zellen aufgenommen, sondern lediglich andocken sollen. Problematisch ist die Effizienz, da gewährleistet sein muss, dass während des Andockens auch der Inhalt in die T-Zellen übertragen wird [110, 111]. Auch kommerziell erhältliche Systeme zur Transfektion (Lipofectamine™, HiPerFect™, DharmaFECT™) wurden genutzt, um T-Zellen zu transfizieren. Jedoch scheitern auch sie überwiegend an der Transfektionseffizienz und Übertragung in die klinische Anwendung [112, 113, 114, 103].

Alle bisherigen Systeme besitzen gewissen Herausforderungen und deshalb bleibt bei allen Systemen die Frage offen, ob sie für eine translationale Nutzung geeignet sind. Denn der Übergang von neuen Therapieansätzen in die klinische Anwendung scheitert oft, trotz vielen vorher gehenden *in vivo* Studien [103]. Besonders bei T-Zellen sind die Effizienz und direkte Adressierung der Nanoträgersysteme oft unzureichend.

1.6. Zelllinien

Zellen, die zur permanenten Zellkultur geeignet sind werden als Zelllinien bezeichnet. Man unterscheidet zwischen Tumorzelllinien und immortalisierten Zellen. Ein weiteres Merkmal von Zelllinien ist, dass sie eine höhere Proliferationsrate als primäre Zellen besitzen und ihre Morphologie sich über viele Passagen nicht verändern [115]. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen von Tumoren ab. Und werden in den nachfolgenden Abschnitten kurz erklärt.

1.6.1. Jurkat Zellen

Die Jurkat Zellen wurden 1976 aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie isoliert. Die Zellen werden dem Zelltyp der T-

Zell-Leukämie zugeordnet. Morphologisch handelt es sich um runde Zellen, die einzeln oder verklumpt in Suspension wachsen. Charakteristisch für die Jurkat Zellen ist, dass sie sehr wenig Zytosol und einen großen Zellkern haben [116].

Die Jurkat Zellen werden normalerweise in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS bei 37°C mit 5 % CO₂ kultiviert und weisen eine Dopplungszeit von 25 bis 35 Stunden auf [116]. Nach Auskunft der DSMZ sind die Jurkat Zellen positiv für die Oberflächenmarker CD2, CD3, CD5, CD6, CD7, TCR und negativ für CD8, CD13 und CD19. Weiterhin sind sie positiv für die alpha/beta-Kette des T-Zellrezeptors, jedoch negativ für die gamma/delta-Kette des T-Zellrezeptors [116].

1.6.2. Murine 2E8 Zellen

Die 2E8 Zellen wurden 1996 von Ishihara et al. als B-Lymphozyten-Klone aus Langzeit-Knochenmarks-Kulturen von BALB/c Mäusen generiert. Die 2E8 Klone zeigten über die Langzeitkultivierung eine durchgängige IL-7-Abhängigkeit [117].

Die Kultivierung der Zellen erfolgt, in Anlehnung an das Whitlock-Witte Medium, in IMDM Medium mit erhöhtem FBS Anteil (20 %), geringerem Natriumbicarbonatgehalt (1,5 mg/ml) und 2-Mercaptoethanol [118]. Da die 2E8 Zellen eine IL-7-Abhängigkeit, sowohl für murines als auch für humanes IL-7, aufweisen, führt für die Kultivierung ohne IL-7 zu dem Absterben der Zellen. Diese Sensitivität gegenüber IL-7 wurde sich für diese Arbeit zum Nutzen gemacht. Dadurch war es möglich zu überprüfen, ob eine Azid- bzw. DBCO-Funktionalisierung einen Einfluss auf die biologische Funktionalität des humanen IL-7 hat.

1.7. Herstellung nanodimensionaler Trägersysteme

In dieser Arbeit wurden nanodimensionale Trägersysteme für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen untersucht.

Dafür wurden zwei Blockcopolymer-Systeme, ((HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA und kationische Nanohydrogele zur Selbstorganisation), und ein Kapselsystem welches aus Ovalbumin besteht, verwendet. Die Blockcopolymer besitzen die Eigenschaft siRNA zu komplexieren und werden über die RAFT Polymerisation hergestellt Die Ovalbumin Kapseln sind innen hohl. Mittels Miniemulsionstechnik, lassen sich beim

Herstellungsprozess Wirkstoffe, wie siRNA, einkapseln (siehe Abschnitt 1.7.3). In den nachfolgenden Abschnitten werden Eigenschaften und Synthese der einzelnen Systeme vorgestellt.

1.7.1. Blockcopolymerere (HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA

Die Blockcopolymerere, bestehend aus Methacrylamid mit einem Amino- und Guanidinblock, weisen ähnliche Eigenschaften wie die CPPs auf [32]. Sie besitzen den Vorteil, dass sich nicht viral sind und über ihre kationischen Eigenschaften siRNA komplexieren können. Weiterhin erlaubt das kationische Potential auch das Durchwandern der Zellmembran und die Aufnahme über die unspezifische Endozytose [54, 32].

Die Herstellung der Blockcopolymerere erfolgte über die wässrige RAFT Polymerisation. Die funktionelle Gruppe, basierend auf Guanidin, erkennt und bindet Phosphatanionen über Wasserstoffbrücken und kann somit die Bindungskapazität von Nukleinsäuren, wie siRNA, erhöhen [32]. Weiterhin ist Guanidin ein Teil der Argininsseitenkette, was die funktionelle Nähe zu den CPPs erklärt [32, 119].

Die nachfolgende Modifizierung mit Triphenylphosphin (TPP) soll nochmals die Aufnahme in Zellen erhöhen und wurde schon erfolgreich bei der zielgerichteten Aufnahme in Mitochondrien verwendet [120].

Der erste Block HPMA, (2-hydroxy-propyl)methacrylamid, wird sehr häufig als Bestandteil für nanodimensionale Trägersysteme verwendet, da es in der Literatur als biokompatibel und nicht immunogen beschrieben wird [121]. Die Herstellung der Blockcopolymerere erfolgte über die RAFT-Polymerisation, während die TPP-Modifizierung in einem nachfolgenden Schritt mittels NHS-Ester vorgenommen wurde. Ilja Tabujew (AK Müllen) ist mit der Herstellung des Blockcopolymerers gelungen, die unterschiedlichen positiven Eigenschaften der Polymerblöcke so zu vereinen, dass ein vielversprechendes nanodimensionales Trägersystem für siRNA und für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen entstanden ist.

1.7.2. Kationische Nanohydrogele zur Selbstorganisation

Kationische Nanohydrogele zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, in wässriger Umgebung zu quellen [122, 31]. Weiterhin bilden klassische Hydrogele über un-

terschiedliche Wechselwirkungen stabile Netzwerke und neigen somit zur Selbstorganisation. Bestehen die Nanohydrogele aus biokompatiblen Polymeren eignen sie sich aufgrund der Größe und Eigenschaft siRNA zu komplexieren als Trägersysteme in der biomedizinischen Anwendung [123, 31].

In der Arbeitsgruppe Zentel von der Universität Mainz, wurde eine Methode zur Synthese von kationischen Nanohydrogelen, basierend auf einem amphiphilen Blockcopolymer, etabliert [31]. Aufgrund der Selbstorganisation lagern sich die Blockcopolymere zu Polymeraggregaten zusammen, deren Kern mittels Spermin vernetzt wird. Dadurch entstehen stabile kationische Kerne, die wiederum siRNA oder andere Oligonukleotide über elektrostatische Wechselwirkungen komplexieren können [31]. Die Freisetzung des Wirkstoffes kann über einen Anionenaustausch durch pH-Wert Absenkung oder durch enzymatische Abbauprozesse erfolgen [31]. Die Vorteile der Nanohydrogele sind ihre Größe, ihre hohe Ladungskapazität mit siRNA und ihr leicht kationisches Zeta-Potential [31].

Um noch kleinere Nanohydrogelpartikel (unter 100 nm im Durchmesser) herzustellen, wurden die verwendeten Polymere Tri(ethylenglycol)methylethermethacrylat (MEO₃MA) und Poly(pentafluorphenylmethacrylat) (P(PFPMA)) mit verkürzter Kettenlänge eingesetzt. Die Herstellung der Blockcopolymere erfolgte auch über die RAFT-Polymerisation mit anschließender Vernetzung mittels Spermin.

In früheren Studien konnte für die Nanohydrogele schon eine gute Aufnahme in Zelllinien und den zuverlässigen Transport von siRNA in Zellen gezeigt werden [31, 68, 124]. Deshalb stellen die neuen, kleineren Nanohydrogele ein interessantes Trägersystem für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen dar.

1.7.3. Miniemulsionstechnik

Bei der Miniemulsionstechnik handelt es sich um eine im AK Landfester sehr gut etablierte Methode um kleine Tröpfchen/Nanopartikel mit hoher Stabilität in einer kontinuierlichen Phase durch Ultraschall herzustellen [125, 126, 127]. Die kleinen Tröpfchen entstehen und bleiben bestehen, weil sie in der kontinuierlichen Phase nicht löslich sind. Mit anschließender Polymerisation können sie stabilisiert werden. Mit dieser Technik lassen sich Nanopartikel in einer Größenbreite von 30 bis 500 nm herstellen [125]. Neben Nanopartikel eignet sich die Miniemulsionstechnik auch um

Nanokapseln, also Nanopartikel mit einer Schale und hohlem Innenraum, herzustellen [128]. Unterschieden werden zwischen der direkten und inversen Miniemulsions-technik. Bei der direkten Miniemulsion handelt es sich um eine Öl-in-Wasser Miniemulsion, bei der die kontinuierliche Phase polar ist, während die disperse Phase unpolar ist. Mit der direkten Miniemulsion lassen sich vor allem hydrophobe Wirkstoffe einkapseln [129]. Im Gegensatz dazu eignet sich die inverse Miniemulsion um hydrophile Wirkstoffe einzukapseln. Hierbei besteht die kontinuierliche Phase aus einem unpolaren Lösungsmittel, während die disperse Phase die Polymere und den Wirkstoff enthalten, welcher durch die Ultraschallbehandlung von den Polymere eingeschlossen wird [128].

In Abbildung 8 ist schematisch die Herstellung einer inversen Miniemulsion dargestellt. Durch die hohe Variabilität der einsetzbaren Polymere, Wirkstoffe und Oberflächenfunktionalisierung ist die Miniemulsionstechnik eine ideale Herstellungsmethode für nanodimensionale Trägersysteme für biomedizinische Anwendungen [128].

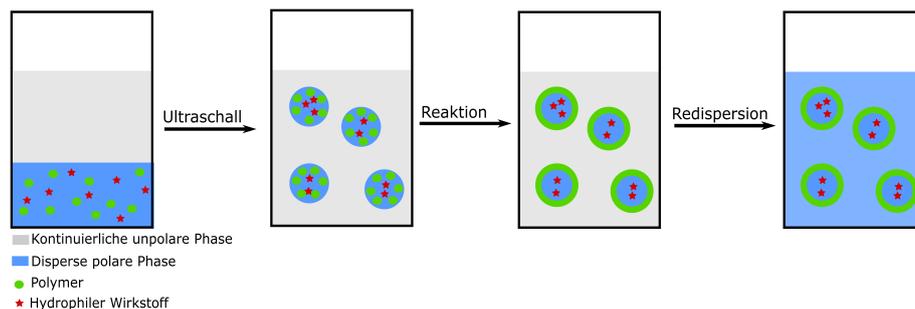


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung einer inversen Miniemulsion. Bei der kontinuierlichen Phase handelt es sich um ein unpolares Lösungsmittel, während die disperse Phase polar ist und sowohl Polymer als auch Wirkstoff enthält. Nach der Ultraschallbehandlung entsteht eine Wasser-in-Öl-Miniemulsion. Durch eine nachfolgende Reaktion entstehen die Kapseln mit dem Wirkstoff als Inhalt. Abbildung modifiziert nach [125, 130, 129, 33].

1.7.4. Ovalbumin Kapseln

Bei dem biomedizinischen Einsatz von synthetischen Trägersystemen ist die Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit oft problematisch. Um dies zu umgehen, wurden Nanokapseln, die aus dem Protein Ovalbumin bestehen von Keti Piradashvili (AK Landfester) angefertigt [33].

Der große Vorteil von Proteinen ist, dass sie meist nicht toxisch, nicht immunogen, biokompatible und bioabbaubar sind [131]. Bioabbaubar, weil proteinspaltende Enzyme, Proteasen, ubiquitär in den Zellen vorhanden sind und somit der Abbau der Nanokapsel und die Freisetzung des Wirkstoffes gewährleistet ist [131, 33]. Weiterhin sind Proteine von besonderem Interesse, weil sie gut verfügbar, wasserlöslich und meist gut charakterisiert sind [131, 132]. Da in den meisten Fällen die primäre Struktur und Molekulargewicht der Proteine bekannt sind, lassen sich sie leicht chemisch modifizieren, um damit die Aufnahme zu verbessern. So wurde bspw. das Chemotherapeutikum Paclitaxel an ein Albuminpartikel gebunden, um die Nebenwirkungen zu senken [133].

Bei Ovalbumin handelt es sich, um das am häufigsten vorkommenden Protein in Vogeleiern und um ein Albumin-Derivat. Ovalbumin wurde als Modell-Proteine verwendet, da es sehr gut erforscht, leicht verfügbar und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung für unterschiedliche Trägersysteme findet [131, 132]. Ein Albumin-Derivat wurde verwendet, da Albumin das häufigste Protein im Blutplasma ist. Weiterhin ist Albumin für den Molekültransport verantwortlich und besitzt eine extrem hohe Liganden Bindungskapazität [33].

Die Ovalbumin Kapseln wurden mittels der inversen Miniemulsionstechnik synthetisiert und an der Oberfläche entweder mit Interleukin-7 (IL-7) oder PepFect14 (PF14) modifiziert. Beide Modifizierungen sollten die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen erhöhen. Während IL-7 gleichzeitig noch die Expansion von tumorgerichteten zytotoxischen T-Zellen stimulieren sollte [134]. Das PF14 gehört zur Familie der zellpenetrierenden Peptiden, welches als Transfektionsagens die Aufnahme in Zellen erhöhen kann [135].

1.8. Motivation

Langfristiges Ziel des Projektes ist die nicht-virale RNA-Transfektion von CD8⁺ T-Zellen, um den Funktionsverlust der Effektorfunktion entgegen zu treten. Als Trägersysteme sollen polymere Nanokapseln und Blockcopolymere dienen, die mit siRNA beladen und die von CD8⁺ T-Zellen aufgenommen werden. Die neuen Transfektionsverfahren sollen gegenüber herkömmlichen Verfahren den Vorteil besitzen, dass es zellschonend ist und die Nukleinsäure bis zu ihrem intrazellulären Wirkort vor enzymatischem Abbau geschützt ist.

In dieser Arbeit erfolgt die detaillierte Untersuchung der Eignung von unterschiedlichen Trägersystemen für die Aufnahme in zytotoxischen T-Zellen. Weiterhin wird die Aufnahme, Toxizität und Verbleib innerhalb der T-Zellen ausführlich untersucht. Als Wirkstoffe für die Trägersysteme soll vor allem siRNA verwendet werden, um inhibitorische Proteine (PD-1 und CTLA-4) herunter zu regulieren. Die beiden Proteine sind bekannt für ihre negative Wirkung auf die Effektorfunktion von T-Zellen bei chronischen Entzündungen und Krebserkrankungen [78]. Weiterhin stellt die Manipulation der T-Zellen mittels Hemmung von PD-1 und CTLA-4 eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar, um das eigene Immunsystem für die Bekämpfung von Krebszellen zu nutzen. Denn durch die Expression von PD-1 und CTLA-4 gehen die T-Zellen in einen Erschöpfungszustand über, der die Effektorfunktion und Proliferationsverhalten der Zellen stark negativ beeinflusst [93].

Die primären zytotoxischen gelten als sehr schwer transfizierbar und herkömmliche Transfektionsmethoden stellten sich überwiegend als ineffizient heraus [103]. Deshalb ist das Hauptziel der Arbeit Trägersysteme zu finden, die in hoher Effizienz in CD8⁺ T-Zellen aufgenommen werden und geeignet sind siRNA in die Zelle zu transportieren.

2. Methoden

2.1. Allgemeine und spezielle Zellkultur von Suspensionszellen

In Tabelle 3 ist die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien aufgelistet. Die Suspensionszellen wurden in der Regel bei 500 g für 5 Min zentrifugiert und in kleinen Zellkulturflaschen stehend kultiviert.

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
RPMI T-Zellen ready	500 ml	RPMI-1640 Medium
	10%	FBS
	1%	PenStrep
	30 ng/ml	OKT-3 Antikörper
	400 bzw. 600 I.E	humanes IL-2
RPMI Jurkat ready	500 ml	RPMI-1640 Medium
	10%	FBS
	1%	PenStrep
RPMI Monozyten Depletion ready	500 ml	RPMI-1640 Medium
	2%	FBS
	1%	PenStrep
IMDM ready	500 ml	IMDM Medium
	20%	FBS
	1%	PenStrep
	4 mM	L-Glutamin
	1,5 g/ml	Natriumbicarbonat
	1 ng/ml	murines IL-7
Einfriermedium	50 ml	FBS
	10%	DMSO

2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden jeweils $50 \cdot 10^6$ nicht adhärenente mononukleäre Blutzellen (nicht adhärenente PBMCs) nach der Isolierung in 1 ml bzw. 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurden die Kryovials in die Einfrierbox Mr. Frosty™ überführt und für 2 Tage bei -80°C eingefroren und anschließend bei -180°C in der Flüssigphase der Kryobank gelagert.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryovials im Wasserbad erhitzt und die Zellsuspension in vorgewärmtes Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g für 5 Min) und in mindestens 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Für die Zellzählung wurden 20 μ l Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und im automatischen Zellzählgerät gemessen oder alternativ in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

2.1.2. Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus aufkonzentriertem peripheren Blut

Zur Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) von gesunden Spendern wurden Buffy Coats von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz verwendet.

Die PBMCs können mittels einer isopyknischen Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Die durch Dichtegradzentrifugation entstandene lederfarbene Schicht wird als Buffy-Coat bezeichnet und enthält B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Thrombozyten und T-Zellen.

Für die Isolierung wurde das aufkonzentrierte Blutkonserven im Verhältnis 1 : 5 mit phosphatgepufferten Salzlösung (engl. *phosphat buffered saline*, PBS⁻) verdünnt und anschließend wurden 35 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, welches 15 ml Separationsmedium enthielt, überführt. Nach der Dichtegradzentrifugation (15 Min, 1100 g, keine Bremse) wurde die Buffy-Coat-Schicht mit den PBMCs abgenommen, welche sich über dem Ficoll[®] befand. Anschließend wurden die PBMCs 2 x mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert (10 Min, 670 g), um die Reste des Ficolls[®] zu entfernen. Die Zellen wurden in 50 ml RPMI Monozyten Depletion ready Medium aufgenommen und über einen 100 μ m Zellsieb gefiltert. Für die Zellzählung wurden 30 μ l Zellsuspension mit 180 μ l 6 %ige Essigsäure vermischt und 5 Min inkubiert, um störende Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde die Probe 1 : 1 mit Trypanblau gemischt und mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für die Monozyten Depletion wurden in 6-well-Platten $15 \cdot 10^6$ Zellen pro well ausgesät und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionszellen (nicht adhären-ten PBMCs) abgenommen. Die Wells wurden 2 x mit PBS⁻ gewaschen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 Min, 470 g) und nochmals mit Essigsäure und Tryp-

anblau (wie oben beschrieben) gezählt. Für die Kryokonservierung wurden $50 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml bzw. 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryovials überführt. Das Einfrieren wurde wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben durchgeführt.

2.1.3. Kultivierung von humanen nicht adhärennten PBMCs

Die aufgetauten PBMCs wurden in kleinen CELLSTAR[®] Zellkulturflaschen kultiviert. Pro Flasche wurden $20 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml RPMI T-Zellen ready Medium kultiviert. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die Zellen wurden wöchentlich mit 30 ng/ml OKT-3 (Anti-CD3 Antikörper, Klon OKT-3) Antikörper und 600 internationale Einheiten (I.E.) Interleukin-2 (IL-2) pro ml restimuliert. Zusätzlich erfolgte einmal wöchentlich ein Mediumswechsel, mit der Zugabe von 400 I.E. IL-2 pro ml. Das Splitten der Zellen erfolgte, wenn die Zellzahl mehr als $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml betrug.

2.1.4. Kultivierung von humanen Jurkat Zellen

Die Jurkat Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen und in der Zellbank im Flüssigstickstoff gelagert. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, aufgetaut und in RPMI Jurkat ready Medium (siehe Tabelle 3) als Suspensionszellen in kleinen Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden 1 bis 2 x wöchentlich gesplittet und mit neuem Medium versorgt. Die vom Hersteller empfohlene Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen wurde nicht überschritten.

2.1.5. Kultivierung von murinen 2E8 Zellen

Die murinen 2E8 Zellen wurden von *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen und nach der Expansion in der Zellbank im Flüssigstickstoff gelagert. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, auftaut und in IMDM ready Medium mit murinem IL-7-Zusatz als Suspensionszellen in kleinen Zellkulturflaschen kultiviert. Die vom Hersteller empfohlene Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ pro ml wurde nicht überschritten. Das Splitten der Zellen erfolgte 2 bis 3 x wöchentlich und mit jedem

Mediumswechsel wurde neues murines IL-7 hinzugefügt. Für die Zellversuche wurde humanes IL-7 verwendet.

2.2. Generierung und Stimulierung von humanen CD8⁺ T-Zellen

Die CD8⁺ T-Zellen wurden mittels magnetischer Zellsortierung aus nicht adhärenenten PBMCs isoliert und anschließend mit einem OKT3 Antikörper und IL-2 stimuliert. Die Herstellung der nicht adhärenenten PBMCs ist in Abschnitt 2.1.2 erläutert.

2.2.1. Aufreinigung humaner CD8⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

Für die magnetische Zellsortierung (engl. *magnetic cell separation*, MACS) wurden die PBMCs mindestens eine Woche lang stimuliert und kultiviert, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Vor der Aufreinigung wurde die Zentrifuge auf 4 °C und der MACS Puffer (PBS⁻, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA) auf 2 bis 8 °C vorgekühlt. Weiterhin wurde die gesamte Aufreinigung auf Eis durchgeführt.

Nachdem die Zellsuspension bei 300 g für 10 Min zentrifugiert wurden, wurden sie in 80 µl pro 10⁷ Zellen in MACS Puffer aufgenommen. Bevor 20 µl CD8 *MicroBeads* pro 10⁷ Zellen hinzugefügt wurden, wurden für die Durchflusszytometrie-Kontrolle 1*10⁵ Zellen separiert. Die Inkubation der CD8 *MicroBeads* erfolgte im Dunkeln bei 4 °C. Anschließend wurden 5 µl Anti-CD8 Antikörper hinzugefügt und nochmals für 5 Min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde die Durchflusszytometrie-Kontrolle mit dem Anti-CD8 Antikörper gefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen und zentrifugiert (300 g für 10 Min). Anschließend wurden die Zellen bis 10⁸ Zellen in 500 µl MACS Puffer aufgenommen.

Die magnetischen Säulen wurde in dem MACS Separator eingesetzt und mit 3 ml MACS Puffer gespült. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Die mit den *MicroBeads* markierten Zellen blieben in der magnetischen Säule, während die nicht markierten Zellen aus der Säule gewaschen wurden. Dafür wurde 3x mit 3 ml MACS Puffer verwendet. Die CD8⁺ T-Zellen ließen sich aus der Säule lösen, indem die Säule aus der Halterung entfernt wurde; mit 5 ml MACS

Puffer wurden die verbliebenen Zellen aus der Säule gedrückt. Weitere $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden, für die Durchflusszytometrie-Kontrolle, separiert und mit Anti-CD8 Antikörper gefärbt.

Die CD8 T-Zellen wurden nochmals zentrifugiert, gezählt, in RPMI T-Zellen ready Medium aufgenommen und mit OKT3/IL-2 stimuliert (wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben).

2.3. Nanodimensionale Trägersysteme

Alle in dieser Arbeit verwendeten nanodimensionalen Trägersysteme wurden von Projektpartnern synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Deshalb wird im Folgenden nur das Prinzip der Herstellung erläutert und auf den grundsätzlichen Aufbau der nanodimensionalen Trägersysteme eingegangen.

2.3.1. Blockcopolymerer via RAFT Polymerisation

Die Blockcopolymerer *N*-(2-hydroxy-propyl)methacrylamid-*s*-*N*-(3-aminopropyl)methacrylamid (HPMA-*s*-APMA) mit terminalem 3-guanidinopropyl-methacrylamid-Block (GPMA) ((HPMA₁₂₆-*s*-APMA₁₄)-GPMA₄₉) mit/ohne TPP Modifizierung wurden von Ilja Tabujew aus dem AK Müllen (MPIP Mainz) mittels der wässrigen RAFT Polymerisation (engl. *aqueous reversible addition-fragmentation chain transfer*, aRAFT) hergestellt. Der Herstellungsprozess wurde in Tabujew *et al.* detailliert beschrieben [32].

Tabelle 4: Charakterisierung der Blockcopolymerer.

Eigenschaft	Blockcopolymer	Blockcopolymer-TPP
Polymer	(HPMA ₁₂₆ - <i>s</i> -APMA ₁₄)-GPMA ₄₉	(HPMA ₁₂₆ - <i>s</i> -APMA ₁₄)-GPMA ₄₉ mit TPP
Durchmesser mit siRNA	99,2 nm	110,6 nm
ohne siRNA	12,6 nm	20,4 nm
Komplexierung Polymer:siRNA	100:1	100:1
Farbstoff	PDI	PDI

Hier eine kurze Beschreibung der Methode nach Tabujew *et al.*:

Das statistische Copolymer HPMA-s-APMA wurde mittels der wässrigen RAFT Polymerisation in Acetat-Puffer bei 70 °C durchgeführt. Als Kettentransferagenz (engl. *chain transfer agent*, CTA) wurde 4-cyano-4'-((phenylcarbonothioyl)thio)pentansäure (CTP) und als radikaler Initiation 4,4'-Azobis(4-cyanovalerinsäure) verwendet. Das entstandene Makro-CTA HPMA-s-APMA wurde, mittels der gleichen Methode, terminal um GPMA verlängert. Nach der Synthese wurde das Blockcopolymer dialysiert und lyophilisiert [32]. Die Entfernung der Thioestergruppe erfolgte nach Perrier *et al.* [136].

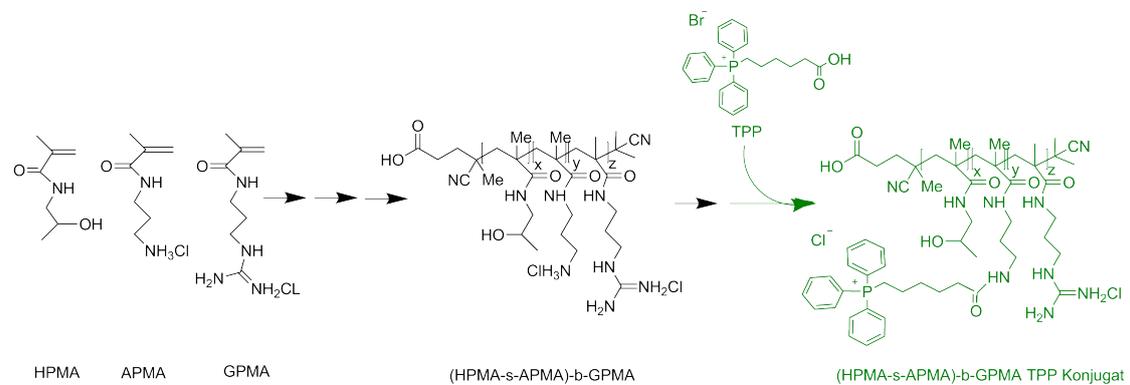


Abbildung 9: Synthese der HPMA-APMA-GPMA Blockcopolymeren mittels der RAFT Polymerisation. Die Polymere HPMA und APMA werden mittels CTP und ACVA zu einem Blockcopolymer polymerisiert. In einem weiteren RAFT Polymerisationsschritt wird der GPMA Block angebunden. Nach der RAFT Polymerisation erfolgt die TPP Modifizierung mittels NHS-Ester-Chemie (in grün dargestellt). Abbildung modifiziert nach Tabujew *et al.* [32].

Die Triphenylphosphin (TPP) Modifizierung erfolgte in einem weiteren Schritt mittels der NHS-Ester-Chemie. In Abbildung 9 ist die Synthese des Blockcopolymeren dargestellt, die TPP Modifizierung ist in grün hervorgehoben.

Die Komplexierung von siRNA und Polymer fand bei Raumtemperatur und im Gewichtsverhältnis 1 : 100 statt. Die Konzentration der eingesetzten siRNA betrug 5 μM . Die Polymer-siRNA-Komplexe wurden für jeden Versuch frisch hergestellt und nach 20-minütiger Komplexierungszeit auf die Zellen gegeben.

2.3.2. Kationische Nanohydrogele via Selbstorganisation

Die kationischen Nanohydrogele wurden von Nadine Leber aus dem AK Zentel (Universität Mainz) hergestellt. Die Synthese zur Herstellung der Nanohydrogele wurde von Lutz Nuhn (AK Zentel) etabliert und in Nuhn *et al.* ausführlich beschrieben [31]. Das Prinzip der kationischen Nanohydrogelpartikel basiert auf der Verwendung von amphiphilen Reaktivester-Block-Copolymeren, die die Neigung zur Selbstorganisation (engl. *self-assembly*) haben.

Das Vorläuferpolymer wurde über die RAFT Polymerisation hergestellt. Der Reaktivester Poly(pentafluorphenylmethacrylat) (P(PFPMA)) wurde als Makro-CTA in einer RAFT-Polymerisation um Tri(ethylenglycol)methylethermethacrylat (MEO₃MA) verlängert, daraus entstand das Blockcopolymer P(MEO₃MA)₂₄-b-P(PFPMA)₃₂ mit einer Dithiobenzoat-Gruppe. Im nächsten Schritt wurde die Endgruppe mittels 4,4'-Azo-bis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) nach Perrier *et al.* abgespalten. Das entstandene Blockcopolymer P(MEO₃MA)₂₄-b-P(PFPMA)₃₂ bildete in polaren, aprotischen Lösungsmitteln Polymer-Aggregate durch Selbstorganisation.

Tabelle 5: Charakterisierung der Nanohydrogele.

Eigenschaft	Nanohydrogele
Polymer	P(MEO ₃ MA) ₂₄ -b-P(PFPMA) ₃₂
Durchmesser	13,1 nm
Komplexierung	
Polymer:siRNA	40:1
Zeta-Potential	13,0 mV
Farbstoff	AlexaFluor647

Eine Vernetzung des hydrophoben Kerns der Polymer-Aggregate, gebildet aus den Reaktivesterblöcken des Blockcopolymers, erfolgte mit dem Amin Spermin. Die Pentafluorphenyl-Reste wurden in diesem Schritt umgesetzt und durch Spermin ersetzt, die so entstandenen Nanohydrogelpartikel wurden bei physiologischem pH-Wert protoniert. Dadurch konnten die Nanohydrogele siRNA komplexieren, die siRNA aufgrund des Phosphodiester-Rückgrats als Polyanion vorlag. Zur Detektion der Partikel wurde das Fluorophor Alexa Fluor[®]647 Cadaverine kovalent angebunden. Die Komplexierung von siRNA mit den Nanohydrogelpartikeln erfolgte in unter-

schiedlichen Verhältnissen (1 : 20, 1 : 40 und 1 : 80) und fand bei Raumtemperatur statt. In Abbildung 10 ist die Zusammensetzung der Nanohydrogele schematisch dargestellt.

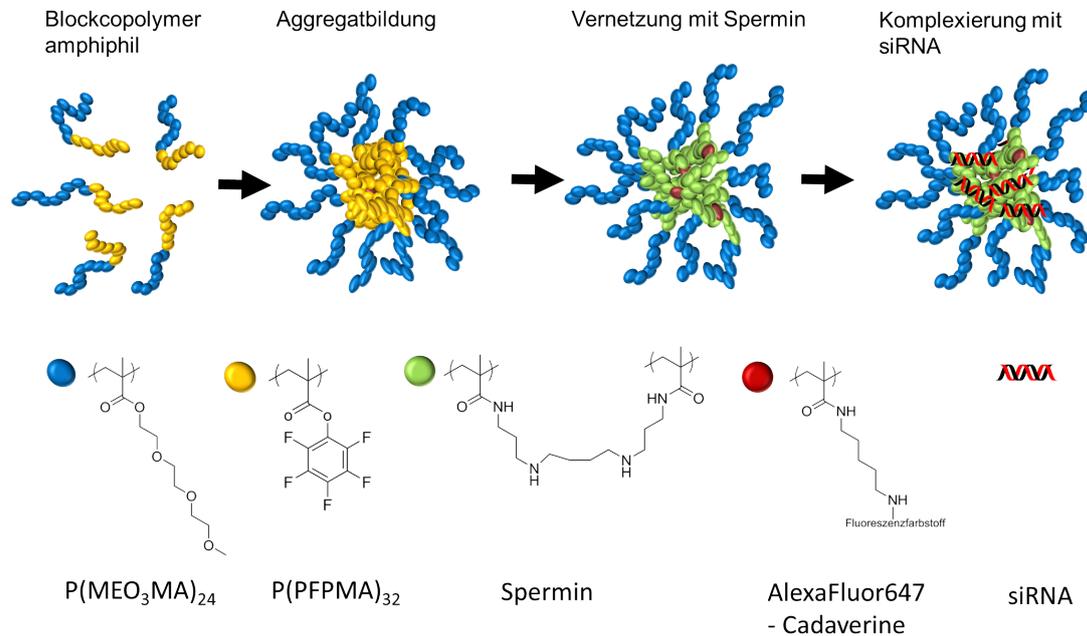


Abbildung 10: Der schematische Aufbau der Nanohydrogele. Das Blockcopolymer P(MEO₃MA)₂₄-b-P(PFPMA)₃₂ wird mit dem Verlinker Spermin vernetzt. Die Nanohydrogele neigen zur Selbstorganisation und können aufgrund des kationischen Zeta-Potential siRNA komplexieren. Abbildung modifiziert nach [31].

2.3.3. Ovalbumin Nanokapseln via Miniemulsionstechnik

Zur Herstellung der Ovalbumin Nanokapseln, die von Ketii Piradashvili (AK Landfester) synthetisiert wurden, ist die Methode der inversen Miniemulsion angewandt worden. Der Herstellungsprozess ist ausführlich in der Veröffentlichung Piradashvili *et al.* erläutert und basiert auf der Technik von Landfester *et al.* [129, 33]. Das Prinzip der Miniemulsionstechnik beruht auf zwei Phasen, die kontinuierliche und die disperse, die nicht miteinander mischbar sind. Mechanisches Rühren bzw. hohe Scherkräfte, wie Ultraschall, unter Zugabe eines Vernetzer (engl. *crosslinker*) ermöglichen die Herstellung einer stabilen Miniemulsion [129, 137, 33].

Tabelle 6: Charakterisierung Ovalbumin Kapseln.

Eigenschaft	Ovalbumin Kapseln
Polymer	Ovalbumin
Durchmesser	175 nm
Zeta-Potential	-19,3 mV
Farbstoff	Cy5

Für die Ovalbumin Nanokapseln wurde die Polyadditionsreaktion innerhalb der inverse Miniemulsion verwendet, dabei befand sich in der wässrigen Phase das Protein Ovalbumin und der Fluoreszenzfarbstoff Cy5-Oligonukleotid, während die kontinuierliche Phase das Cyclohexan und Poly((ethylen-co-butylene)-b-(ethylenoxid) (P(E/B)-b-EP)) als grenzflächenaktives Tensid (engl. *surfactant*) enthielt. Das *Surfactant* wurde tröpfchenweise zu der wässrigen Lösung pipettiert. Die entstandene Präemulsion wurde durch Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurde tröpfchenweise das *Surfactant* P(E/B)-b-EP) und Toluylendiisocyanat (TDI) als *Crosslinker* hinzugefügt. Die Aufreinigung der Ovalbumin Nanokapseln erfolgte durch Zentrifugation, um das *Surfactant* zu entfernen. Der Transfer in die wässrige Phase erfolgte tröpfchenweise unter Rühren in eine wässrige SDS-Lösung, mit anschließender Ultraschallbehandlung. Durch weiteres Rühren über Nacht verdampfte das Cyclohexan und das SDS wurde über Zentrifugation entfernt. Schlussendlich konnten die Ovalbumin Nanokapseln in Kochsalzlösung redispergiert werden und waren gebrauchsfertig für die biologischen Versuche [33]. In Abbildung 11 ist schematisch die Herstellung der Ovalbumin Nanokapsel mittel inversen Miniemulsion dargestellt. Um Ovalbumin-Kapseln zu funktionalisieren wurde eine DBCO-Gruppe mittels NHS-Ester an das Oberfläche gebracht. In einem nachfolgenden Schritt konnte IL-7-Azid mittels kupferfreien Klickreaktion angeklickt werden.

Das gleiche Verfahren wurde auch von Staffan Lindberg (AK Landfester) genutzt, um das zellpenetrierende Peptid PF14 an die Oberfläche von Ovalbumin-Kapseln zu bringen. Die dafür verwendeten Ovalbumin-Kapseln wurden nach der gleichen Methode, wie oben beschrieben, hergestellt und waren somit identisch mit den IL-7-Azid modifizierten Ovalbumin-Kapseln.

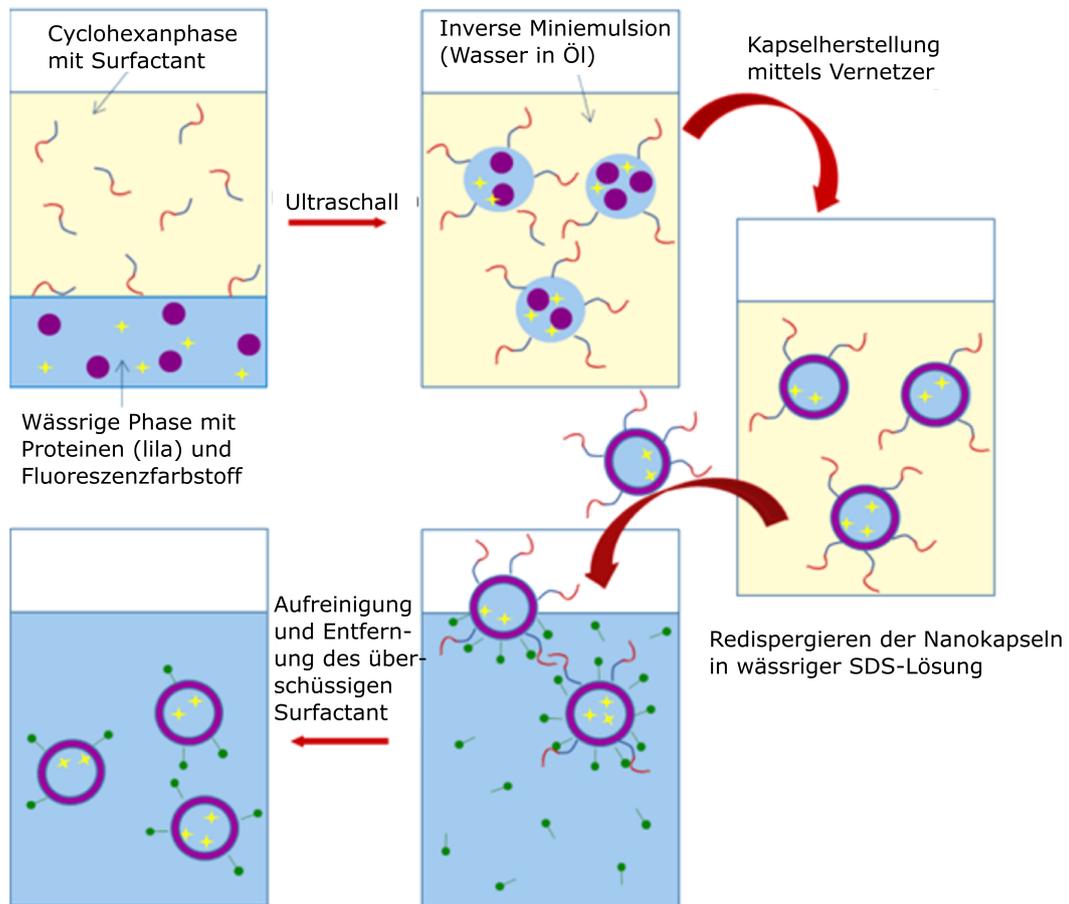


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung von Ovalbumin Nanokapseln mittels inversen Miniemulsion. Das Surfactant befindet sich in der Cyclohexanphase während sich die Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff in der wässrigen Phase befinden. Nach der Ultraschallbehandlung entsteht eine Wasser-in-Öl-Miniemulsion (inverse Miniemulsion). Die Kapselherstellung erfolgt über einen Vernetzer und darauf werden die Nanokapseln redispersiert in einer wässrigen SDS-Lösung. Im letzten Schritt erfolgt die Entfernung des überschüssigen Surfactant. Nachdruck der modifizierten Abbildung gestattet von [33]. Copyright 2015 American Chemical Society.

2.4. Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen in CD8⁺ T-Zellen

In den folgenden Abschnitten werden die Methoden zur Aufnahme, Zytotoxizität und Verbleib der nanodimensionalen Trägersysteme in CD8⁺ T-Zellen beschrieben. Die Versuche wurden für alle nanodimensionalen Trägersysteme durchgeführt.

2.4.1. Analyse der Aufnahme und Zytotoxizität der nanodimensionalen Trägersystemen im Durchflusszytometer

Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen

Für die Untersuchung der Aufnahme von nanodimensionalen Trägersystemen wurden $2 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 24- oder 48-well-Platten in 300 μ l RPMI T-Zellen ready Medium mit 400 I.E. IL-2 ausgesät. Direkt im Anschluss wurden 150 μ g/ml Nanohydrogele oder 200 μ g/ml Blockcopolymere oder 300 μ g/ml Ovalbumin Kapseln hinzugegeben, falls andere Konzentrationen nicht genannt sind. Die Nanohydrogele und Blockcopolymere fanden entweder mit siRNA komplexiert oder unkomplexiert Verwendung. Die Standardinkubationszeit der nanodimensionalen Trägersysteme betrug 24 Stunden.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben in 1,5 ml Eppis überführt, die Wells 1 x mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert (500 g, 5 Min). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zellen in 100 μ l einer 1:100 verdünnter Zombie AquaTM-Lösung resuspendiert. Der 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur folgte ein Waschschriff mit PBS⁻ und ein Zentrifugationsschritt (500 g, 5 Min). Falls notwendig wurden die Proben mit 4 % PFA fixiert oder direkt im Durchflusszytometer analysiert.

Für die Zeitkinetik über 24 Stunden mit den Messzeitpunkten 30 Min, 1 Std, 3 Std, 6 Std, 18 Std und 24 Std wurden $2 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 48-well-Platten mit 200 μ l RPMI T-Zellen ready Medium mit 400 I.E. IL-2 ausgesät. Die Zeitkinetikstudien wurden für die Blockcopolymere und kationischen Nanohydrogele durchgeführt. Die nanodimensionalen Trägersysteme wurden dafür mit siRNA komplexiert; das Komplexierungsverhältnis siRNA zu Blockcopolymer betrug 1 : 100 und das Komplexierungsverhältnis für siRNA zu Nanohydrogele betrug 1 : 40. Beide Nanopartikel wur-

den 20 Min bei Raumtemperatur mit siRNA komplexiert und anschließend auf die Zellen pipettiert (Blockcopolymer 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; kationische Nanohydrogele 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden die Proben in 1,5 ml Eppis überführt, die Wells 1 x mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert (500 g, 5 Min). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zellen in 100 μl einer 1:100 verdünnter Zombie AquaTM-Lösung resuspendiert. Der 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur folgte ein Waschschrift mit PBS⁻ und ein Zentrifugationsschritt (500 g, 5 Min). Die Fixierung erfolgte mit 50 μl einer 4%igen PFA-Lösung für 10 Min bei 4 °C. Zur Lagerung bei 4 °C wurden die Proben nochmals zentrifugiert (1000 g, 10 Min) und in 1 ml PBS⁻ resuspendiert. Die Analyse fand im Durchflusszytometer statt.

Die Zeitkinetikversuche wurden mit 2 %, 10 % und 100 % FBS Gehalt im Medium durchgeführt. Die für den Versuch benötigten Zellkulturmedien wurden frisch angesetzt aus RPMI-1640 Medium mit FBS, 1 % PenStrep und 400 I.E. IL-2 und bevor die *Nanocarrier*-siRNA-Komplexe zu den Zellen gegeben wurden, wurde das normale Zellkulturmedium durch das Medium mit 2 %, 10 % und 100 % FBS ersetzt.

Für die Zeitkinetikstudien mit den Blockcopolymeren wurden als Vergleichszellen immature dendritische Zellen (engl. *immature dendritic cells*, iDCs) verwendet. Dafür wurden 1 Tag vor Versuchsstart die iDCs aufgetaut; $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well mit 200 μl Medium in 24-well Platten ausgesät. Das Zellkulturmedium für iDCs bestand aus RPMI-1640 Medium mit 2 % FBS, 1 % PenStrep, 500 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GMCSF. Wie bei den T-Zellen wurde auch für die iDCs Medium mit 2 %, 10 % und 100 % FBS Gehalt für den Versuch verwendet, d.h. bevor die Polymer-siRNA-Komplexe zu den iDCs gegeben wurden, wurde das Medium ersetzt. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden die iDCs in 1,5 mL Eppis überführt. Die Wells wurden 2 x gründlich mit PBS⁻/EDTA (5 mM EDTA) gewaschen, um die adhärenen iDCs abzulösen. Im weiteren Verlauf wurden die iDCs gleich wie die CD8⁺ T-Zellen behandelt.

Zytotoxizität der nanodimensionalen Trägersystemen

Die Zytotoxizität der Blockcopolymere und Nanohydrogele wurde mittels einer Annexin V und 7-AAD/PI Färbung untersucht. Hierfür wurden $2 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 500 μl (Blockcopolymer-Proben) bzw. 200 μl (Nanohydrogel-Proben) RPMI T-Zellen

ready Medium mit 400 I.E. IL-2 ausgesät. Die nanodimensionalen Trägersystemen wurden für diesen Versuch nicht mit siRNA komplexiert. Die Konzentrationen für die Blockcopolymere betrug 75, 150, 200, 300, 600, 800 und 1000 $\mu\text{g/ml}$. Die Nanohydrogele sollten in den Konzentrationen 50, 75, 100, 150, 200, 300 und 600 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden. Als Positivkontrolle diente 20 %iges DMSO und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen. Die Inkubationszeit betrug für die Blockcopolymere 96 Std und für die Nanohydrogele 24 Std. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben nach Herstellerprotokoll gewaschen, gefärbt und in 500 μl Annexin V Binding Buffer resuspendiert. Für die Messung im Durchflusszytometer wurden nochmals 1 ml PBS⁺ hinzugefügt.

2.4.2. Analyse der Aufnahme und Verbleib der nanodimensionalen Trägersystemen im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop

Mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl. *confocal Laser scanning microscopy*, cLSM) kann die Aufnahme und der Verbleib der nanodimensionalen Trägersysteme in den Zellen nachgewiesen werden. Diese Methode wurde nicht quantitativ genutzt. Für die Experimente wurde ein TCS SP5 II Mikroskop, mit Argon, DPSS und HeNe Lasern, verwendet.

Die cLSM Versuche wurden in 8 Well μ -Slide von ibidi durchgeführt. Die eingesetzte Zellzahl betrug $1 \cdot 10^5$ Zellen in 300 μl Zellkulturmedium mit 400 I.E. IL-2.

Das allgemeine Vorgehen für die Aufnahmeversuche war, dass die Zellen ausgesät wurden und die entsprechende Konzentration an Nanopartikel hinzugefügt wurde (Blockcopolymer 200 $\mu\text{g/ml}$; Nanohydrogele 150 $\mu\text{g/ml}$; Ovalbumin Kapseln 300 $\mu\text{g/ml}$). Nach einer 3 bis 24 stündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte eine Färbung der Zellmembran mittels *CellMask green/orange/red*. Dafür wurden die Zellen aus dem ibidi in 1,5 ml Eppis überführt und 1 x mit PBS⁻ gewaschen. Der *CellMask* Farbstoff wurde 1 : 1000 in PBS⁻ verdünnt. Pro Probe wurden 100 μl verdünnter *CellMask*TM oder WGA Alexa Fluor488 Farbstoff pipettiert und für 10 Min im Brutschrank inkubiert. Falls notwendig wurden die Proben mit 4 % PFA fixiert und bei 4 °C gelagert. Für das *Live-Cell-Imaging* wurden die Zellen unfixiert und direkt nach der Zellmembranfärbung im cLSM analysiert.

2.4.3. Analyse der metabolischen Aktivität der nanodimensionalen Trägersystemen nach der Aufnahme

Die metabolische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels den MTS-Assays ermittelt. Der Assay beruht auf dem Prinzip der Reduktion des wasserlöslichen MTS Farbstoffes zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Die Umsetzung findet nur in viablen Zellen statt, da dafür das Enzym NADPH-Dehydrogenase benötigt wird [138]. Die Konzentration des Formazan wird mittels Plattenmessgerät photometrisch mittels Absorption gemessen. Somit liefert der MTS-Assay Auskunft über die metabolische Aktivität der Zelle, da das Absorptionssignal proportional zu der Anzahl an viablen Zellen ist.

Für den MTS-Assay wurden $1 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 96-well-Platten in 100 μ l RPMI T-Zellen ready Medium mit 400 I.E. IL-2 ausgesät. Die Nanopartikel wurden in gleicher Konzentration wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, eingesetzt. Nach der Inkubationszeit von 24 bis 96 Std wurden 20 μ l des MTS-Reagents zu den Proben pipettiert. Als Positivkontrolle diente 20%iges DMSO und als Negativkontrolle Zellen ohne Nanopartikel. Die Inkubationszeit des MTS-Reagents betrug 3 bis 4 Std, anschließend wurde der Farbumschlag im *Platereader* mittels Absorption bei 490 nm ermittelt. In Abbildung 30 ist schematisch die Umsetzung von MTS zu Formazan gezeigt.

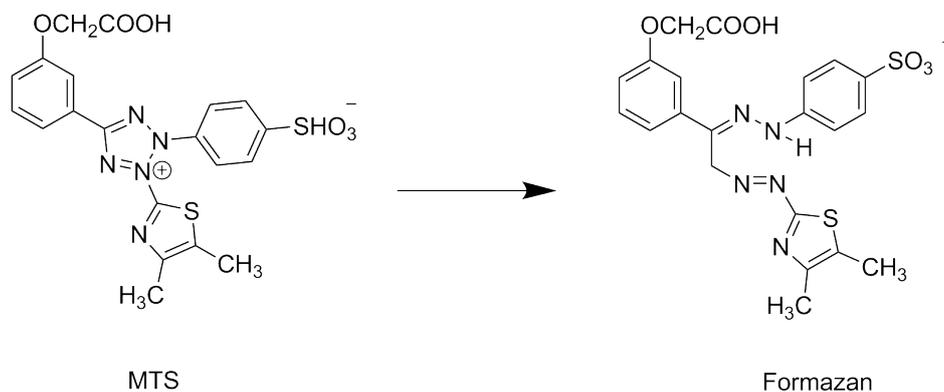


Abbildung 12: Umsetzung von MTS durch NADH-induzierte intrazelluläre Prozesse zum Formazan.

2.5. Analyse der Kolokalisation in intrazellulären Kompartimenten

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Methoden erläutert, die zur Untersuchung des intrazellulären Verbleibs der Blockcopolymeren durchgeführt wurden. Nach der Aufnahme von Nanopartikeln kann der intrazelluläre Transport der Nanopartikel durch Kolokalisationsstudien untersucht werden.

2.5.1. Kolokalisation mit Mitochondrium

Für die Kolokalisationsstudie wurden $1 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 300 μ l RPMI T-Zellen ready Medium mit 400 I.E. IL-2 in 8-well-ibidi ausgesät. Anschließend wurden 1 μ l *MitoTracker green* Mitochondrienfarbstoff in 2,5 ml RPMI T-Zellen ready Medium verdünnt und anschließend wurden 300 μ l auf die Proben pipettiert. Die Blockcopolymeren wurden im Verhältnis 100 : 1 mit 5 μ M siRNA für 20 Min bei Raumtemperatur komplexiert. Im Anschluss wurden die Proben in einer Konzentration von 200 μ g/ml auf die Proben pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit fand das *Live-Cell-imaging* mittels cLSM statt.

2.5.2. Kolokalisation im frühen Endosomen

Für die Antikörperfärbung wurden $2 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen mit 200 μ l siRNA-Blockcopolymer-Komplexen inkubiert. Blockcopolymeren wurden zuvor im Verhältnis 100 : 1 mit 5 μ M siRNA für 20 Min bei Raumtemperatur komplexiert. Nach 3-stündiger Inkubationszeit der CD8⁺ T-Zellen mit den Komplexen erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % Histofix für 5 Minuten. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Min mit 0,1 %iger Saponinlösung permeabilisiert. Anschließend wurden Proben 2 x mit PBS⁻ gewaschen und für 10 Min bei 3000 g zentrifugiert. Für die primäre Antikörperfärbung wurde Anti-Rab5 Antikörper 1 : 100 verdünnt und 100 μ l Antikörperlösung wurden pro Probe pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubationszeit wurden die Proben 2 x mit PBS⁻ gewaschen. Der Sekundärantikörper Anti-mouse Alexa Fluor488 wurde 1 : 1000 verdünnt und für 30 Min mit den Proben inkubiert bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben 2 x mit PBS⁻ gewaschen und bis zur Analyse mittels cLSM bei 4 °C gelagert.

2.5.3. Kolokalisation bei Transferrin/Dextran Aufnahme

Eine gleichzeitige Aufnahme von Transferrin-FITC/Dextran-FITC und Blockcopolymeren gibt Auskunft, ob die Blockcopolymeren über die Clathrinabhängige Endozytose bzw. Makropinozytose aufgenommen werden. Transferrin-FITC und Dextran-FITC sind nach der Aufnahme im frühen Endosomen vorzufinden.

Für den Versuch wurden $1 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 200 μ l RPMI T-Zellen ready Medium mit 400 I.E. IL-2 in 8-well ibidi kultiviert. Blockcopolymeren wurden im Verhältnis 100 : 1 mit 5 μ M siRNA für 20 Min bei Raumtemperatur komplexiert. Anschließend wurden 50 μ l Komplexe auf die Zellen pipettiert. Gleichzeitig wurden entweder 3 μ l der fertigen Transferrin-FITC Lösung oder 3 μ l Dextran-FITC zu den Proben pipettiert. Die Inkubationszeit von CD8⁺ T-Zellen mit Komplexen und Transferrin-FITC oder Dextran-FITC betrug 45 Min., im Anschluss fand das *Live-Cell-Imaging* mittels cLSM statt.

2.5.4. Kolokalisation im Lysosom

Für die Kolokalisationsstudie wurden $1 \cdot 10^5$ CD8⁺ T-Zellen in 200 μ l RPMI T-Zellen ready Medium in 8-well ibidi kultiviert. Die Blockcopolymeren wurden im Verhältnis 100 : 1 mit 5 μ M siRNA für 20 Min bei Raumtemperatur komplexiert und anschließend auf die Proben in einer Konzentration von 200 μ g/ml pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Färbung der Lysosomen mittels *LysoTracker green*. Dafür wurde der *LysoTracker green* Farbstoff 1 : 1000 mit RPMI T-Zellen ready Medium verdünnt und pro well wurden 200 μ l verdünnter *LysoTracker green* pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für 2 Stunden. Anschließend fand das *Live-Cell-Imaging* im cLSM statt.

2.6. Biofunktionalität von modifiziertem IL-7

Die kupferfreie Klick-Chemie ist eine nicht toxische, schnelle und effiziente Möglichkeit, um zwei Moleküle miteinander zu verknüpfen. Dabei handelt es sich um eine Cycloadditionsreaktion zwischen einem Azid und einem Alkin (engl. *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*, SPAAC) ohne den Katalysator Kupfer. Die Methode findet häufig im biologischen Bereich Anwendung, da es die Anknüpfung und Modifi-

kation von Biomolekülen ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde die SPAAC Methode verwendet, um modifiziertes IL-7 an die Oberfläche von Nanokapselsystemen zu bringen.

Die Modifizierung von IL-7 wurde sowohl mit einem NHS-PEG4-Azid als auch mit einem NHS-PEG4-DBCO (von Katja Klein) durchgeführt. In beiden Fällen wurde die Struktur von IL-7 verändert und deshalb war die Überprüfung der Biofunktionalität von IL-7 nach der Modifizierung notwendig. In den nachfolgenden Abschnitten werden die dafür verwendeten Methoden, *CellTrace Violet* Proliferationsassay und BrdU Proliferationsassay, beschrieben.

Die Experimente wurden mit einer IL-7-abhängigen Zelllinie (2E8) durchgeführt. Die 2E8 Zellen sind von murinem Ursprung und proliferieren nur in Anwesenheit von IL-7 im Zellkulturmedium (siehe Abschnitt 1.6.2).

2.6.1. *CellTrace Violet* Proliferationsassay

Der *CellTrace Violet* Farbstoff ist ein permanenter Zellfarbstoff der ein aminreaktives fluoreszierendes Molekül enthält und durch die Plasmamembran diffundiert. Im Zellinneren wird das zuerst nicht fluoreszierende Molekül durch die zelluläre Esterase in das fluoreszierende Derivat konvertiert. Die nun aktive Succinimydyl-Ester-Gruppe bindet kovalent an die Amingruppe von Proteinen. Deshalb ist der *CellTrace Violet* eine permanente Zellfärbung, die durch die Zellteilung an die Tochterzellen weiter gegeben wird. Da die Intensität des Farbstoffes in der Tochtergeneration nur halb so stark ist, können über die Fluoreszenzintensität die Proliferationszyklen der Zellen analysiert werden.

Für diesen Versuch wurden 2E8 Zellen verwendet, die mindestens 2 Tage zuvor nicht mehr mit murinem IL-7 stimuliert wurden. Weiterhin wurden die Zellen in gekühltem PBS⁻ 2 x für 10 Min bei 4 °C und 100 g zentrifugiert, um tote Zellen abzutrennen. Anschließend wurde die Zellzahl mittel automatischem Zellgerät ermittelt. Bevor die Zellen in eine 24-well Platte ausgesät wurden, wurde die *CellTrace Violet* Färbung nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dafür wurde pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, die in 1 ml PBS⁻ resuspendiert waren, 1 μ l *CellTrace Violet* Farbstoff pipettiert. Die Inkubation fand für 20 Min im Brutschrank statt. Anschließend wurde das 5-fache Volumen an IMDM ready Medium ohne IL-7 hinzugefügt, 5 Min inkubiert und bei

500 g für 5 Min zentrifugiert, um freien *CellTrace Violet* Farbstoff zu entfernen. Die Zellen wurden in Well-Platten ausgesät ($5 \cdot 10^5$ Zellen pro well) und mit humanem, murinem, humanen azidiertem und humanem DBCO-modifizierten IL-7 in den Konzentrationen 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 mg/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml versetzt. Als Negativkontrolle dienten 2E8 Zellen ohne *CellTrace Violet* Farbstoff, aber mit unterschiedlichen IL-7-Typen und IL-7-Modifizierungen.

Nach der 4-tägigen Inkubation wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie-Messung vorbereitet. Die Vorbereitung fand bis zur Messung auf Eis statt, dafür wurden die Zellen in 1,5 ml Eppis überführt und 1 x mit PBS⁻ gewaschen. Für die Lebend-Tot-Färbung wurde 20 Min vor der Messung PI (Endkonzentration 200 μ g/ml) hinzugefügt.

2.6.2. BrdU Proliferationsassay

Der BrdU Proliferationsassay detektiert mittels eines Anti-BrdU Antikörper während der Zellteilung in der DNA inkorporiertes BrdU. Wenn die Zellen mit BrdU-haltigem Medium kultiviert werden, dann wird dieses Pyrimidinanalog in die neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen an Stelle der Nukleinbase Thymidin eingebaut. In Abbildung 13 sind die Strukturformel von BrdU und der Nukleinbase Thymidin dargestellt.

Damit der Anti-BrdU Antikörper das eingebaute BrdU binden kann, ist die Denaturierung der DNA notwendig. Der Sekundärantikörper ist HRP konjugiert und setzt das Substrat TMB mittels Chemolumineszenzreaktion um. Der Farbumschlag ist proportional zum eingebauten BrdU, welches ein direkter Indikator für die Proliferation ist. Für diesen Versuch wurden 2E8 Zellen verwendet, die mindestens 2 Tage zuvor nicht mehr mit murinem IL-7 stimuliert wurden. Weiterhin wurden die Zellen in gekühltem PBS⁻ 2 x für 10 Min bei 4 °C und 100 g zentrifugiert, um tote Zellen abzutrennen. Anschließend wurde die Zellzahl mittel automatischem Zellgerät ermittelt und in eine 12-well Platte, mit $5 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml IMDM ready Medium, ausgesät. Anschließend wurden die 2E8 Zellen mit humanem, murinem, humanen azidiertem und humanem DBCO-modifizierten IL-7 in den Konzentrationen 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml versetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne IL-7 inkubiert wurden. Nach 2 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde die Zell-

2. Methoden

zahl mittels automatischem Zellzählgerät ermittelt. Für den BrdU Assay wurden pro well 40 000 Zellen im 4-fach Ansatz in eine schwarze 96-well Platte mit transparentem Boden ausgesät. Die Zellen wurden in 100 μ l IMDM ready Medium kultiviert; mit den unterschiedlichen IL-7-Typen, -Modifizierungen und -Konzentrationen versetzt. Das BrdU Reagent wurde 1 : 100 mit IMDM Medium verdünnt und pro well wurden 10 μ l verdünntes BrdU Reagent pipettiert. Nach der 3-stündigen Inkubationszeit, im Brutschrank, wurde die 96-well Platte bei 300 g für 10 Min zentrifugiert und anschließend vorsichtig das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mittels der Fixierungs-/Denaturierungslösung für 30 Min denaturiert und fixiert. Nachdem die Lösung entfernt wurde, wurden direkt 100 μ l des Detektionsantikörpers auf die Proben pipettiert. Nach der 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Proben 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l pro well des HRP-konjugiertem Sekundärantikörpers pipettiert und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Waschschrift wiederholt und es wurden 100 μ l TMB Substrat hinzugefügt und für weitere 30 Min inkubiert. Nachdem die Stopplösung (100 μ l pro well) hinzugefügt wurde, wurde die Absorption im *Platereader* bei 450 nm gemessen.

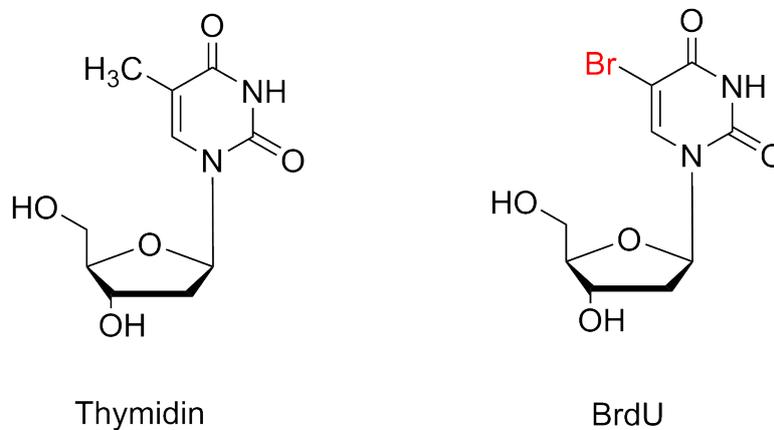


Abbildung 13: Strukturformel des Pyrimidinanalogs BrdU, welches anstelle von der Nukleinbase Thymidin in die DNA eingebaut wird. Anschließend lässt sich die Menge des eingebauten BrdU mittels Antikörper detektieren und quantifizieren.

2.6.3. Tamra-DBCO-Farbstoff zum Nachweis von IL-7-Azid

Zum Nachweis, dass IL-7 trotz Azid-Funktionalisierung an den IL-7-Rezeptor binden kann, wurde IL-7-Azid mit einem Tamra-DBCO-Farbstoff verknüpft. Die Fluoreszenz des Farbstoffes entstand nur bei Verknüpfung von der Azid- mit der DBCO-Gruppe. Dafür wurde der Farbstoff im Verhältnis 0,8:1 zu IL-7-Azid eingesetzt, um einen Überschuss an Farbstoff zu gewährleisten. IL-7-Azid und Tamra-Farbstoff wurden gemischt und für 1 Std im Kühlschrank aufbewahrt. CD8⁺ T-Zellen und 2E8 Zellen wurden mittels *CellMask deep red* Membranfarbstoff angefärbt. Anschließend wurden sie auf Eis gelagert und markiertes IL-7-Azid wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels cLSM.

3. Ergebnisse und Diskussion

In den nachfolgenden Kapiteln soll dargestellt werden, welche nanopartikulären Systeme für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen getestet wurden. Die potentielle Trägersysteme sind für die Anwendung im Bereich *Drug Delivery* vorgesehen. Deshalb ist neben der Aufnahme die Freisetzung des *Cargos* ein wesentlicher Punkt. Jedoch gelten die CD8⁺ T-Zellen als sehr schwer transfizierbar, deshalb lag der Fokus in dieser Arbeit hauptsächlich auf der Identifizierung von passenden Trägersystemen.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

Die (HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA Blockcopolymer stellen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (kationische Ladung, 100 nm Durchmesser) ein sehr vielversprechendes Trägersystem für siRNA dar. In den nachfolgenden Kapitel soll gezeigt werden, dass die Blockcopolymer auch ein effektives Transfektionsagenz für CD8⁺ T-Zellen sind, die für gewöhnlich wenig aufnehmen. Weiterhin soll der Verbleib der Blockcopolymer in den CD8⁺ T-Zellen näher untersucht werden.

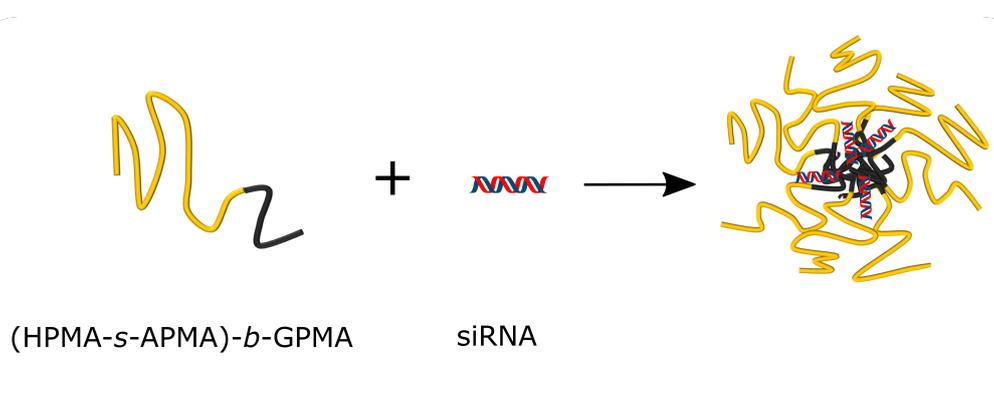


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Komplexbildung aus (HPMA-*s*-APMA)-*b*-GPMA Blockcopolymer mit siRNA. Komplexbildung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen kationischen Blockcopolymeren und anionischen siRNA-Molekülen. Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Die Synthese und Entwicklung wurde von Ilja Tabujew (AK Müllen) durchgeführt. In Kapitel 1.7.1 und ist die Herstellung der Blockcopolymere genau erläutert.

3.1.1. Biokompatibilität der Blockcopolymere

Anhand von unterschiedlichen Krebszelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die Blockcopolymere nicht toxisch sind (nicht veröffentlichte Daten von Ilja Tabujew). Da Krebszelllinien deutlich unempfindlicher als primäre Zellen sind, wurde die Zytotoxizität für CD8⁺ T-Zellen extra überprüft. Dafür wurde nur das Blockcopolymer mit TPP-Modifizierung verwendet und für 72 Stunden mit CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Anschließend wurde eine 7-AAD/Annexin-V-Färbung durchgeführt. Die Blockcopolymere wurden unkomplexiert in den Konzentrationen 75, 150, 200, 300, 600 und 800 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Eine 7-AAD/Annexin-V-Färbung ermöglichte die Unterscheidung von lebendigen (Annexin V negativ, 7-AAD negativ), frühen apoptotischen (Annexin V positiv), späten apoptotischen (Annexin V, 7-AAD positiv) und nekrotischen (7-AAD positiv) Zellen. Somit war eine feinere Unterscheidung der Zytotoxizität möglich. Und im Vergleich zum klassischen MTS-Assay wurde die tatsächliche toxische Wirkung der Substanz auf Zellen untersucht und nicht deren Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass bei allen Proben eine Viabilität von mindestens 70% vorhanden war. Lediglich runde 20-25% der Zellen waren früh apoptotisch und runde 3% waren spät apoptotisch. Somit lässt sich im Vergleich zur Negativkontrolle, unbehandelte Zellen, sagen, dass die Blockcopolymere die Viabilität von CD8⁺ T-Zellen nicht beeinflussen hat. Weiterhin konnte von unterschiedlichen Gruppen gezeigt werden, dass sowohl das Vorläufer-Blockcopolymer als auch die Bausteine HPMA, APMA und GPMA nicht zytotoxisch waren [32, 139, 140]. So wurde die Toxizität des HPMA-Copolymers ausführlich in der Veröffentlichung von Kelsch *et al.* untersucht. In dieser Studie wurden die HPMA-Copolymere als Surfactant für die Nanopartikelherstellung mittels Miniemulsionsverfahren verwendet. Die Zytotoxizität wurde an HeLa-Zellen getestet. Nach 72 Stunden und bis zu einer Konzentration von 1200 $\mu\text{g/ml}$ Nanopartikel konnte keine signifikante Zytotoxi-

3. Ergebnisse und Diskussion

zität nachgewiesen werden [140]. Somit konnte gezeigt werden, dass trotz hoher Konzentrationen und langer Inkubationszeiten die HPMA-Copolymere als Surfactant keinen zytotoxischen Einfluss auf HeLa-Zellen besaßen. Das wiederum war ein wichtiger Hinweis, dass die HPMA-Copolymere auch für primäre Zellen nicht toxisch sein könnten, welches durch die, in dieser Arbeit, durchgeführten Experimente bestätigt wurde.

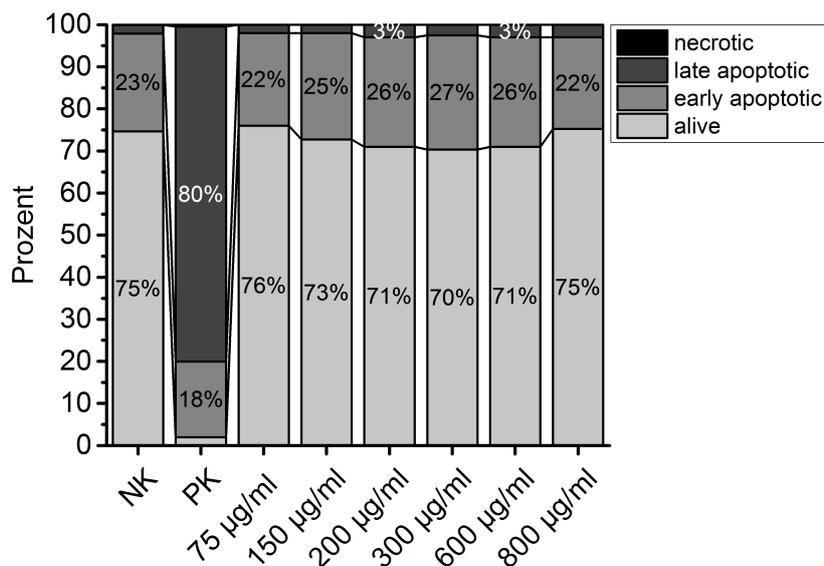


Abbildung 15: Die Ermittlung der Zytotoxizität des Blockcopolymers mit TPP Modifizierung wurde an CD8⁺ T-Zellen anhand einer 7-AAD/Annexin V Färbung durchgeführt. Dafür wurden Blockcopolymere in einer Konzentration von 75 µg/ml bis 800 µg/ml über einen Zeitraum von 72 Stunden mit T-Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und als Positivkontrolle mit 5% DMSO behandelte Zellen. Es werden lebendige (7-AAD negativ, Annexin V negativ), früh apoptotische (Annexin V positiv), spät apoptotische (Annexin V positiv, 7-AAD positiv) und nekrotische Zellen (7-AAD positiv) unterschieden.

3.1.2. Aufnahmestudien der Blockcopolymere in CD8⁺ T-Zellen

Die TPP Modifizierung soll die Aufnahme der Blockcopolymere in Zellen verbessern. Das konnte schon für HEK293T Zellen gezeigt werden (nicht veröffentlichte Daten von Ilja Tabujew). Da die CD8⁺ T-Zellen als sehr schwer transfizierbar gelten, sollte die Aufnahme der Blockcopolymere mit/ohne TPP Modifizierung auch für diese Zellen gezeigt werden.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

In Abbildung 16 ist die Aufnahme von a) Blockcopolymer-TPP und b) Blockcopolymer ohne TPP Modifizierung in CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden nach 3-stündiger Partikelinkubation mittels cLSM aufgenommen. Es ist zu erkennen, dass die Blockcopolymere mit TPP im Zytosol erkennbar sind, während die Proben ohne TPP an der Zelloberfläche anhaften. Diese Bilder zeigen, dass Blockcopolymere mit TPP leichter ins Zellinnere gelangen. Ursprünglich war die TPP Modifizierung gedacht, um Substanzen ins Mitochondrium zu navigieren [141, 142]. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht gemacht werden (siehe Abbildung 20). Jedoch ist zu erkennen, dass eine höhere Aufnahme durch die Modifizierung vorhanden war und das war in dieser Arbeit das primäre Ziel.

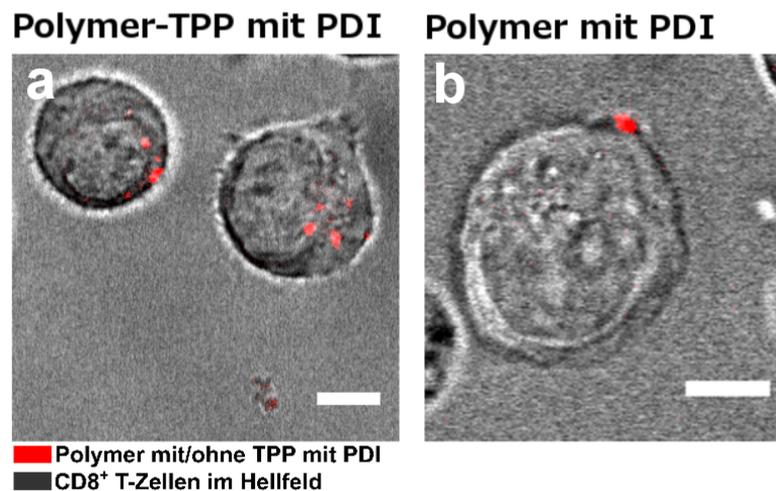


Abbildung 16: Fluoreszenzaufnahmen nach Aufnahme von a) Blockcopolymer-TPP und b) Blockcopolymer ohne TPP in CD8⁺ T-Zellen. Beide Blockcopolymere sind kovalent mit dem Farbstoff PDI markiert. Die CD8⁺ T-Zellen sind im Hellfeld dargestellt und die Blockcopolymere in rot. Die Inkubationszeit der Blockcopolymere mit den Zellen betrug 3 Stunden. a) Polymer-TPP ist deutlich innerhalb der Zelle erkennbar, während in b) das Polymer ohne TPP an der Zellmembran außerhalb lokalisiert ist. Maßstabsbalken 5 µm.

Um die Aufnahme zu quantifizieren wurden die mittlere Fluoreszenzintensität (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) des PDI-Farbstoffes, der zur Markierung kovalent an die Blockcopolymere gebunden war, ermittelt. Darüber ließ sich die Interaktion zwischen Blockcopolymeren und CD8⁺ T-Zellen quantifizieren. In Abbildung 16

3. Ergebnisse und Diskussion

sind die Ergebnisse dargestellt, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Zu erkennen ist, dass die Blockcopolymere mit TPP eine etwas höhere Aufnahme zeigten, im Vergleich zu der Probe ohne TPP. Dass der Unterschied relativ gering war, könnte daran liegen, dass im Durchflusszytometer nicht zwischen Signal in der Zelle und Signal an der Zelloberfläche unterschieden werden kann. Somit wurden Blockcopolymere, die sich lediglich an der Zelloberfläche befanden, im Durchflusszytometer auch als positives Signal detektiert. Wie jedoch in Abbildung 16 und 20 zu erkennen ist, befanden sich hauptsächlich die Blockcopolymere ohne TPP an der Zelloberfläche und weniger im Zytosol.

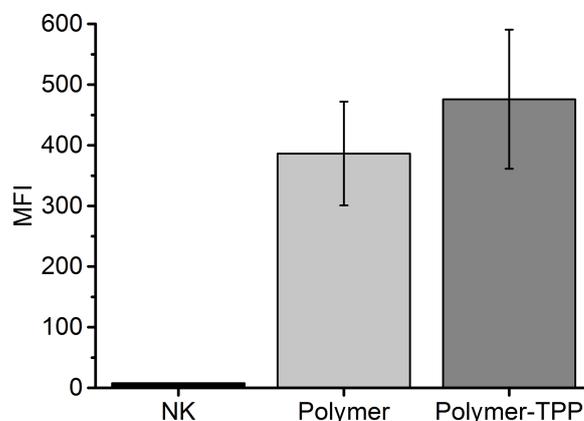


Abbildung 17: Vergleich der Aufnahme von Blockcopolymer mit/ohne TPP Modifizierung in CD8⁺ T-Zellen. Messung erfolgte im Durchflusszytometer und ermittelt wurde der MFI des PDI Farbstoffes. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden nach 3-stündiger Inkubationszeit mit Blockcopolymeren fixiert und im Durchflusszytometer quantifiziert.

3.1.3. Zeitkinetik der Aufnahme von Blockcopolymeren in CD8⁺ T-Zellen

Die Aufnahmegeschwindigkeit von Nanomaterialien in CD8⁺ T-Zellen ist für jedes Trägersystem unterschiedlich und wird erheblich durch das Vorhandensein von Proteinen im Zellkulturmedium beeinflusst.

In dem nachfolgenden Versuch, welcher in Abbildung 35 dargestellt ist, wurde das Aufnahmeverhalten der Blockcopolymere unter dem Einfluss von unterschiedlichem FBS-Gehalt untersucht. Verglichen wurden a) CD8⁺ T-Zellen und b) unreife dendri-

3.1. Blockcopolymere (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

tische Zellen (engl. *imature dendritic cells*, iDCs). Die Quantifizierung der Blockcopolymeraufnahme erfolgte im Durchflusszytometer und durch die Berechnung des MFI. Dargestellt in hellgrau ist die Zeitkinetik der Proben mit 100% FBS im Medium. Hier zeigte sich die geringste Aufnahme über die Messzeitpunkte. Nach 24 Stunden lag der MFI für die T-Zellen unter 10, während der MFI für iDCs bei 50 lag. Hier zeigte sich schon eine 5-fach geringere Aufnahmerate der T-Zellen. Eine mögliche Erklärung für die geringe Aufnahme beider Zellarten ist der hohe Gehalt an FBS Proteine im Medium, die durch die Ausbildung einer Proteincorona die Aufnahme in Zellen verminderte. Der Unterschied zwischen iDCs und T-Zellen ist durch die unterschiedlichen Aufnahmewege zu erklären, die nachfolgend diskutiert werden. Für die CD8⁺ T-Zellen könnte die Größe der Blockcopolymer-Protein-Aggregate der entscheidende Faktor für die reduzierte Aufnahme sein. Denn durch das starke kationische Zeta-Potential der Blockcopolymere könnte eine starke Interaktion mit den Proteinen entstanden sein, die wiederum zu großen Aggregaten führten [32, 143]. Es wurde weiterhin vermutet, dass die T-Zellen eine Größenlimitierung bei der Aufnahme besaßen, die für die direkte Translokation über die Zellmembran bei 100 nm lag [19, 144]. Somit war sehr wahrscheinlich, dass bei 100% FBS im Medium es zu größeren Aggregaten als 100 nm kam und dadurch die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen nicht mehr möglich war.

Wenn jedoch im Vergleich die Ergebnisse der iDCs betrachtet werden, dann ist hier erkennbar, dass 100% FBS im Medium auch hier zu einer reduzierten Aufnahme führte. Da es sich bei dendritische Zellen jedoch um Fresszellen handelte, die Aggregate bis zu einer Größe von 5 μm aufnehmen können, war die Größe hier vermutlich nicht für die reduzierte Aufnahme verantwortlich [145]. Jedoch wurde schon in anderen Veröffentlichungen der Effekt der reduzierten Aufnahme bei hohem Gehalt an Proteinen im Medium bei dendritischen Zellen beschrieben [146, 147]. So war hier vor allem die Zusammensetzung der Proteincorona entscheidend, die wiederum eine Aufnahme in dendritische Zellen erhöhte oder reduzierte [146].

In mittelgrau dargestellt, die Proben mit 10% FBS im Medium, das entsprach dem normalen FBS-Gehalt des Zellkulturmediums. Es zeigte sich eine höhere Aufnahme im Vergleich zu den Proben mit 100% FBS. Sowohl für die T-Zellen als auch für die iDCs war nach 3 und bis 18 Stunden ein deutlicher Anstieg des MFIs zu erkennen. Jedoch war der MFI der iDC Proben, um ein 3-faches höher als bei den T-Zellen.

3. Ergebnisse und Diskussion

In dunkelgrau dargestellt sind die Proben mit 2% FBS. Es war die höchste Aufnahme für beide Zellarten zu erkennen. Während bei den T-Zellen durchgehend ein höherer MFI zeigte, wurde der Unterschied bei den iDCs erst nach 6 Stunden deutlich. Nach 24 Stunden war der MFI der T-Zellen um ein 2,5-faches niedriger als bei den iDCs.

Im Vergleich zwischen T-Zellen und iDCs ließ sich für alle Proben erkennen, dass der MFI der iDC Proben deutlich höher war als bei den T-Zellen. Das lag darin begründet, dass iDCs als Fresszellen gelten und eine sehr hohe Phagozytoserate haben und dadurch mehr aufnehmen als CD8⁺ T-Zellen [148, 149].

Die Ergebnisse zeigten, dass der MFI höher war, wenn der Proteingehalt im Medium abnahm. Diese Tendenz konnte auch bei den Nanohydrogelen beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2.3).

Weiterhin konnte anhand der Zeitkinetik der optimale Inkubationszeitpunkt ermittelt werden und dieser lag bei 18 Stunden für die CD8⁺ T-Zellen.

Der Einfluss der Proteine auf die Aufnahme wird in Abschnitt 3.2.3 ausführlich diskutiert.

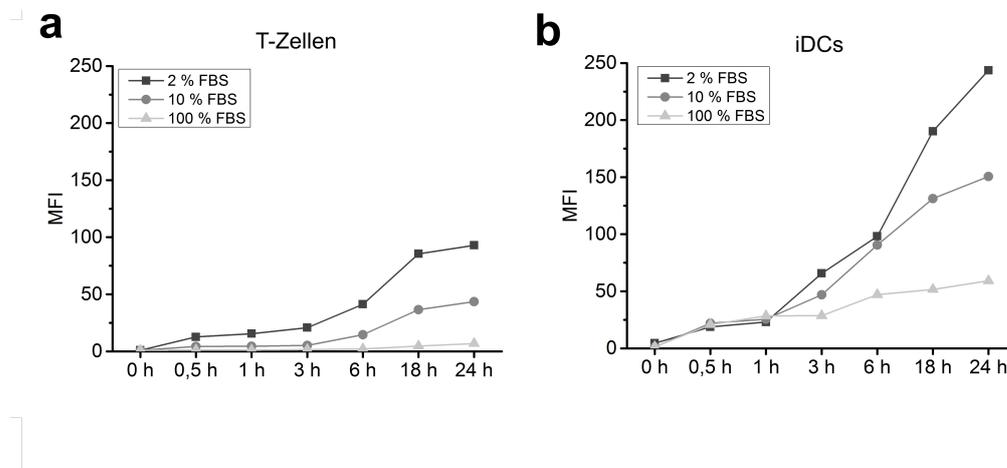


Abbildung 18: Quantifizierung der Blockcopolymeraufnahme im Durchflusszytometer mittels MFI. Gemessen wurde die Aufnahme von siRNA-Blockcopolymer-Komplexe in a) CD8⁺ T-Zellen und b) iDCs bei unterschiedlichem FBS-Gehalt im Zellkulturmedium. An den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 18 h und 24 h wurden die Proben fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.1.4. Konzentrationskinetik der Aufnahme von Blockcopolymere in CD8⁺ T-Zellen

Eine Aufnahmestudie mit unterschiedlichen Blockcopolymer-Konzentrationen wurde angefertigt, um die geringsten Konzentration zu ermitteln, bei denen eine Aufnahme statt fand. Hierfür wurde das Blockcopolymer-TPP mit siRNA komplexiert und in den Konzentrationen 12,5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 300 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden mit CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. In a) ist die Quantifizierung der Blockcopolymer-TPP-siRNA-Komplexe im Durchflusszytometer, durch die Berechnung des MFI des PDI-Farbstoffes, welcher kovalent an die Blockcopolymere gebunden war, dargestellt. Zu erkennen ist eine gleichmäßige Zunahme des MFIs mit steigender Partikelkonzentration. Eine deutliche Erhöhung war zwischen 200 und 300 $\mu\text{g/ml}$ zu erkennen. In b) sind Fluoreszenzaufnahmen mit den Konzentrationen 12,5, 50, 150 und 300 $\mu\text{g/ml}$ Blockcopolymer-siRNA-Komplexe dargestellt. Die Zellmembran war mittels *CellMask green* Membranfarbstoff markiert. Ab 50 $\mu\text{g/ml}$ Komplexen war eine Aufnahme in die CD8⁺ T-Zellen zu erkennen und mit steigender Konzentration nahm das Signal innerhalb der Zelle zu. Somit wurde gezeigt, dass sich die Polymere innerhalb der Zelle und nicht an der Zellmembran befanden.

In Studien konnte gezeigt werden, dass magnetische Nanopartikel innerhalb von 5 Minuten von T-Lymphozyten und Jurkat Zellen aufgenommen wurden und eine Erhöhung der Konzentration zu keiner Steigerung der Aufnahme führte [150]. Das widerspricht den Ergebnissen aus dem oben beschriebenen Versuch. Vermutlich liegt der Unterschied darin begründet, dass unterschiedliche Materialien verwendet wurden und die Blockcopolymere eine deutlich längere Inkubationszeit als 5 Minuten benötigten, um von den T-Zellen aufgenommen zu werden. Wie groß der Einfluss unterschiedlicher Materialien für die Aufnahme in Zellen ist, wurde in dieser Arbeit gezeigt und ausführlich in Abschnitt 3.3 diskutiert. Steinfeld *et al.* vermutet hinter der guten Aufnahme der magnetischen Nanopartikel endozytotische Mechanismen, da die Elektroporation keinen positiven Einfluss gegenüber der direkten Inkubation mit Nanopartikeln zeigte. Jedoch liefert die Studie keinen Nachweis für eine Endozytose der magnetischen Nanopartikeln [150]. Im Vergleich dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Blockcopolymere und Nanohydrogele nicht über endo-

3. Ergebnisse und Diskussion

zytische Aufnahmemechanismen aufgenommen werden (siehe Abschnitt 3.1.5). Dies könnte in der Beschaffenheit der Nanomaterialien begründet sein, die in dieser Arbeit verwendeten Nanomaterialien waren in ihrer Struktur und Funktion den zellpenetrierenden Peptiden (engl. *cell penetrating peptides*, CPPs) sehr ähnlich und diese durchwandern ohne aktiven Mechanismus die Zellmembran [19, 52].

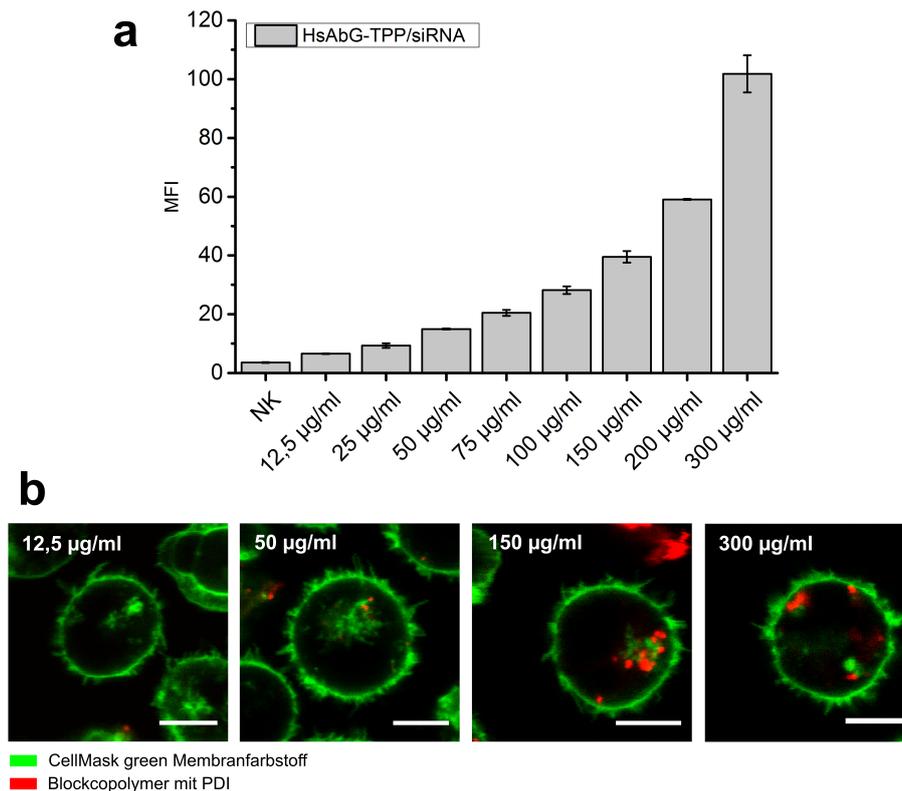


Abbildung 19: Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Blockcopolymeren auf die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen. a) Die Aufnahme wurde quantifiziert mittels Durchflusszytometrie durch Berechnung des MFI des PDI-Farbstoffes. Die Inkubationszeit der Blockcopolymeren mit Zellen betrug 18 Stunden. Zu erkennen ist eine kontinuierliche Zunahme des MFI mit steigender Konzentration an Blockcopolymeren. Es ist keine Sättigungsgrenze zu erkennen. b) Verifizierung der Aufnahme mittels cLSM Fluoreszenzaufnahmen. Nach 18-stündiger Inkubation der Blockcopolymeren-siRNA-Komplexe (rot) wurde die Zellmembran mittels *CellMask green* gefärbt. Zu erkennen ist, dass sich die Polymere in der Zelle befinden und nicht außerhalb an der Zellmembran. Weiterhin ist deutlich sichtbar, mit zunehmender Blockcopolymer-Konzentration lassen sich auch mehr Blockcopolymeren in der Zelle nachweisen. Maßstabsbalken 5 µm.

Ferner konnte Iida *et al.* mittels magnetischen Nanopartikeln nachweisen, dass die Größe der Partikel einen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme in T-Zellen hatte [144]. Weiterhin wurde beschrieben, dass die magnetischen Partikel zur Aggregatbildung im Medium neigten [144]. Dieser Effekt ist gut bekannt und wird oft im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Proteincorona gebracht [143]. Welchen Einfluss Proteine auf die Aufnahme, von den in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikeln, haben wurde in Abschnitt 3.1.3 und 3.2.3 diskutiert.

3.1.5. Intrazellulärer Verbleib der Blockcopolymer in CD8⁺ T-Zellen

Bisher wurde die Aufnahme der Blockcopolymer in CD8⁺ T-Zellen untersucht. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, wo sich die Blockcopolymer intrazellulär befanden. Um dies aufzuklären, wurden unterschiedliche Kollokalisationsexperimente mittels cLSM durchgeführt. Gleichzeitig konnten Erkenntnisse zu möglichen Aufnahmewege gesammelt werden. In Kapitel 1.2 sind die möglichen Aufnahmewege erklärt und dargestellt.

Kollokalisierung mit Mitochondrien

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, sollte die TPP Modifizierung zum einen die Aufnahme erhöhen, zum anderen Partikel ins Mitochondrium navigieren [120]. Die Idee Mitochondrien als Zielort für einen Wirkstoff zu nutzen ist von wachsendem Interesse in aktuellen Zellstudien [151, 152]. Besonders für kationische Nanomaterialien, die über elektrostatische Wechselwirkungen siRNA komplexieren können, scheint das Mitochondrium ein geeignetes Ziel zu sein. Denn durch den niedrigen pH-Wert innerhalb der Mitochondrien kann ein Anionenaustausch stattfinden und so theoretisch die siRNA freisetzen [124, 32].

Um den Verbleib der Blockcopolymer im Mitochondrium zu untersuchen wurde ein Kollokalisationsexperiment durchgeführt. Dabei wurden die Mitochondrien mittels Mitochondrien-Farbstoff, *MitoTracker green*, angefärbt und gleichzeitig mit Blockcopolymeren inkubiert. In Abbildung 20 sind CD8⁺ T-Zellen mit *MitoTracker green* und a) Blockcopolymer-TPP und b) Blockcopolymer ohne TPP dargestellt. Bei einer vorhandenen Kollokalisierung würde sich das rote und grüne Signal überlagern. Bei beiden Proben war das nicht der Fall. Somit konnte eine Kollokalisierung ausgeschlos-

3. Ergebnisse und Diskussion

sen werden. Das bedeutet, die Blockcopolymeren waren intrazellulär nicht im Mitochondrium lokalisiert.

Im Vergleich der beiden Bilder lässt sich jedoch erkennen, dass das Blockcopolymer-TPP besser in CD8⁺ T-Zellen aufgenommen wurden und dass das Blockcopolymer ohne TPP tendenziell an der Zellmembran lokalisiert waren. Somit unterstützt dieses Experiment die Erkenntnisse aus Abschnitt 3.1.2. Zusammenfassend lässt sich sagen, die TPP-Modifizierung erhöhte scheinbar nur die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen und navigierte die Blockcopolymeren nicht in das Mitochondrium.

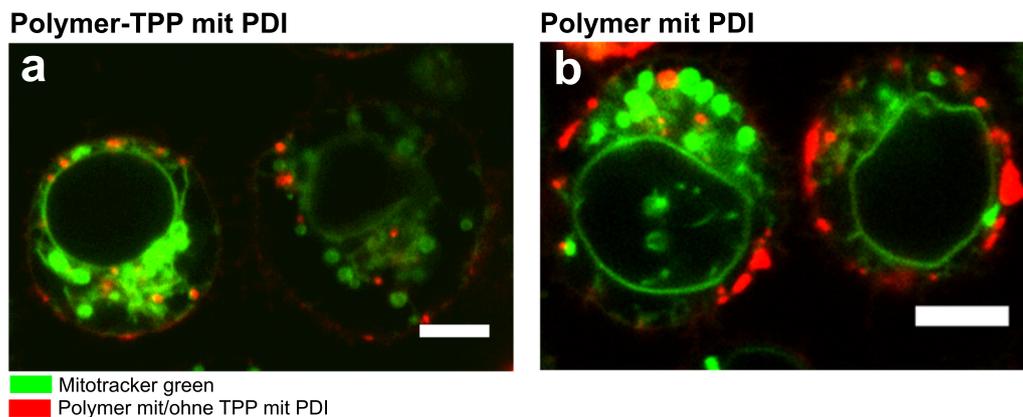


Abbildung 20: CLSM Aufnahmen während der Aufnahme von a) Polymer-TPP und b) Polymer ohne TPP in CD8⁺ T-Zellen. Die Mitochondrien sind mit *MitoTracker green* angefärbt, der unspezifisch die Nucleusmembran anfärbt. Beide Polymere sind mit dem Farbstoff PDI kovalent gekoppelt. Die Zugabe von Polymer und *MitoTracker* Farbstoff erfolgte unmittelbar vor der Analyse im cLSM. Die Aufnahmen wurden ca. 30 Minuten nach Beginn des *Live cell imaging* angefertigt. a) Polymer-TPP ist deutlich innerhalb der Zelle erkennbar, während in b) das Polymer ohne TPP an der Zellmembran außerhalb lokalisiert ist. Maßstabsbalken 5 μm .

Aufnahme mittels Makropinozytose

Die Makropinozytose ist eine Form der Endozytose und ermöglicht die Aufnahme von großen Volumina an Flüssigkeit oder extrazellulären Komponenten, wie Nanopartikel [44, 41]. Im Kontrast zu der Phagozytose ist die Makropinozytose nicht direkt initiiert durch Interaktionen mit Rezeptoren oder Liganden [153]. Die dabei entstandenen Vesikel werden als Makropinosom bezeichnet und zählen auch zu den intrazellulären endozytotischen Vesikeln. Wie alle endozytotischen Vesikel können auch die Makropinosomen nach einer gewissen Zeit mit Lysosomen verschmelzen [42].

3.1. Blockcopolymere (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

Weiterhin wurde die Makropinozytose als möglicher Aufnahmeweg für kationische CPPs diskutiert [45].

Um nachzuweisen, ob Nanopartikel über die Makropinozytose in Zellen aufgenommen wurden, wurde ein Kolokalisationsexperiment mit markiertem Dextran durchgeführt. Dextran gehört neben der Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) zu den Flüssigphasenmarkern, die vor allem in Makropinosomen nach der Aufnahme vorzufinden sind.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse dargestellt. Dextran-FITC und Blockcopolymere mit/ohne TPP wurden ins Zellmedium pipettiert und anschließend direkt im cLSM analysiert. In a) ist die Negativkontrolle, in b) das Blockcopolymer-TPP und in c) das Blockcopolymer ohne TPP dargestellt. Makropinosomen sind als kleine grüne Punkte in den Zellen zu erkennen. Werden die Blockcopolymere über die Makropinozytose aufgenommen, würde eine Kolokalisation mit dem Dextran-Signal vorliegen. Für beide Blockcopolymere war das nicht der Fall. Somit kann eine Aufnahme über die Makropinozytose für die Blockcopolymere ausgeschlossen werden.

Da die Blockcopolymere in ihren chemischen Eigenschaften den CPPs ähnlich waren, wäre eine Aufnahme über Makropinozytose eine realistische Möglichkeit. Beschrieben wurde das vor allem für CPPs, die Proteinsequenzen des HI-Virus besitzen [45]. Das war für die in dieser Arbeit verwendeten Blockcopolymere nicht der Fall und auch die Ergebnisse zeigten, dass eine Aufnahme via Makropinozytose nicht der Fall war. Weiterhin werden in der Literatur vor allem Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) im Zusammenhang mit Makropinozytose und T-Zellen beschrieben, da es sich bei APCs um Fresszellen handelt, die eine hohe Aufnahme rate haben und Antigene an ihrer Oberfläche präsentieren [154, 155, 156]. Diese Antigenpräsentation ist notwendig, um T-Zellen zu aktivieren und um schließlich eine immunologische Synapse zwischen APCs und T-Zellen auszubilden [155]. Somit war es nicht überraschend, dass die CD8⁺ T-Zellen keine Aufnahme über Makropinozytose aufwiesen, da diese Zellen eine sehr geringe Makropinozytoserate besitzen. Dies ist auch deutlich in Abbildung 21, an den wenigen grünen Punkten innerhalb der Zellen, zu erkennen.

3. Ergebnisse und Diskussion

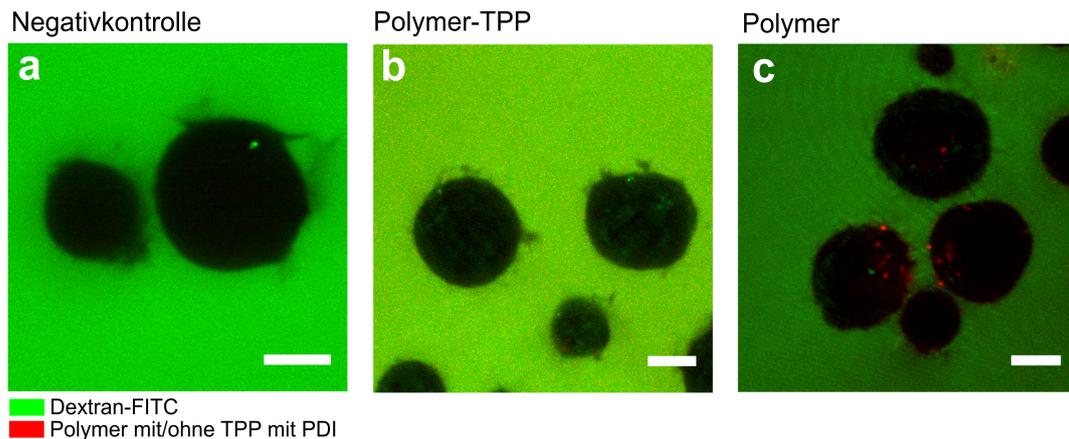


Abbildung 21: CLSM Aufnahmen während der Aufnahme von a) Dextran-FITC, b) Polymer-TPP mit Dextran-FITC und c) Polymer mit Dextran-FITC in CD8⁺ T-Zellen. Die Polymere wurden zuvor mit 5 μm siRNA komplexiert (Verhältnis 100 : 1). Die T-Zellen sind als dunkle Schatten zu erkennen, da das Dextran-FITC ins Medium gegeben wurde. Die Aufnahmen wurden als *Live-Cell-Imaging* aufgenommen. a) der grüne Punkt in der Zelle ist ein mit Dextran-FITC gefülltes Vesikel, welches durch Makropinozytose aufgenommen wurde. b) keine Kolokalisation zwischen Dextran-FITC und Polymer-TPP PDI zu erkennen. c) keine Kolokalisation mit Dextran-FITC und Polymer PDI vorhanden. b) und c) in beiden Fällen ist somit eine Polymeraufnahme via Makropinozytose unwahrscheinlich. Maßstabsbalken 5 μm .

Aufnahme mittels Clathrin-abhängiger Endozytose

Zellen nutzen die Endozytose für die Aufnahme von extrazellulären Nährstoffen, Makromolekülen und Oberflächenrezeptoren oder -liganden. Weiterhin ist die Endozytose auch der Eintrittsweg von Pathogenen und Nanopartikeln, um ins Zellinnere zu gelangen. Es gibt viele unterschiedliche Endozytosewege und die Clathrin-abhängige Endozytose zählt zu den am besten erforschten Aufnahmewegen [35]. Die Clathrin-abhängige Endozytose erfordert die gleichzeitige Internalisierung von Rezeptoren, wie Transferrin-Rezeptor, Rezeptor-Tyrosinkinase oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren [35, 157].

Um nachzuweisen, ob die Aufnahme von Blockcopolymeren in CD8⁺ T-Zellen über die Clathrin-abhängige Endozytose statt findet, eignet sich ein Kolokalisationsexperiment mit markiertem Transferrin. Denn, wie oben beschrieben erfolgt bei der Clathrin-abhängigen Endozytose eine Internalisierung des Transferrinrezeptors.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

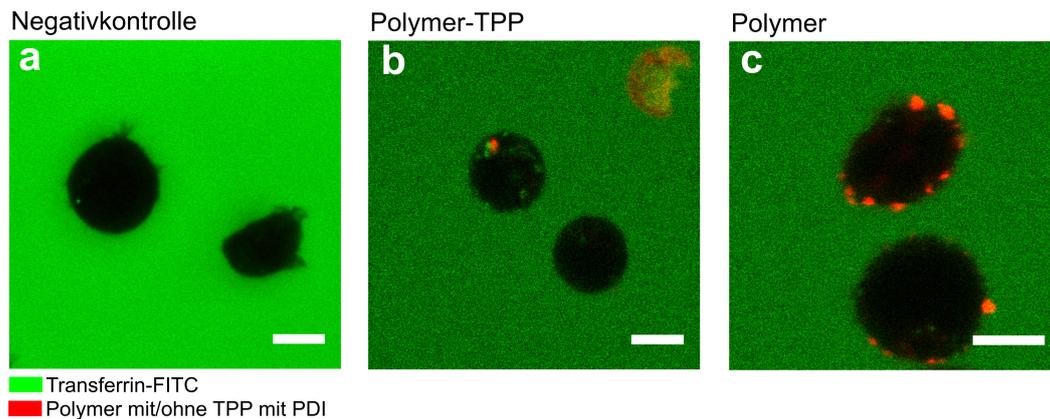


Abbildung 22: CLSM Aufnahmen während der Aufnahme von a) Transferrin-FITC, b) Polymer-TPP PDI mit Transferrin-FITC und c) Polymer PDI mit Transferrin-FITC in CD8⁺ T-Zellen. Die Polymere wurden zuvor mit 5 μm siRNA komplexiert (Verhältnis 100:1). Die T-Zellen sind als dunkle Schatten zu erkennen, da das Transferrin-FITC ins Medium gegeben wurde. Die Aufnahmen wurden als *Live-Cell-Imaging* aufgenommen. a) der grüne Punkt in der Zelle ist ein mit Transferrin-FITC gefülltes Vesikel, welches durch Clathrin-abhängiger Endozytose aufgenommen wurde. b) und c) keine Kolo-kalisation zwischen Transferrin-FITC mit Polymer-TPP PDI und Transferrin-FITC mit Polymer PDI zu erkennen. In beiden Fällen ist somit eine Polymeraufnahme via Makropinozytose unwahrscheinlich. Maßstabsbalken 5 μm .

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Kolo-kalisationsstudie mittels cLSM dargestellt. Transferrin-FITC und Blockcopolymer mit/ohne TPP wurden ins Zellmedium pipettiert und anschließend direkt im cLSM analysiert. In a) ist die Negativkontrolle, in b) das Blockcopolymer-TPP und in c) das Blockcopolymer ohne TPP dargestellt. Die endozytotischen Vesikel sind als kleine grüne Punkte innerhalb der Zelle zu erkennen. Eine Überlagerung der Signale würde bei einer gleichzeitigen Aufnahme von Transferrin-FITC und Blockcopolymer vorliegen und würde somit für eine Clathrin-abhängigen Aufnahme sprechen. In Abbildung 22 b) und c) war jedoch keine Signalüberlagerung zu erkennen. Somit konnte eine Aufnahme der Blockcopolymer über eine Clathrin-abhängige Endozytose ausgeschlossen werden. Anhand den Aufnahmen war zu erkennen, dass wenige endozytotischen Vesikel innerhalb der Zellen vorhanden waren. Das ließ rückschließen, dass die CD8⁺ T-Zellen eine geringe Clathrin-abhängige Endozytoserate besaßen. Dies wurde durch die Literatur bestätigt, die vor allem von Clathrin-unabhängiger Endozytose in Zusammenhang mit Interleukin-Rezeptor-Internalisierung handelt [158, 159, 46].

Kolokalisation mit frühen Rab5 positiven Endosomen

Die frühen Endosomen sind heterogene Vesikel, die im frühen Stadium des intrazellulären Transportes entstehen [63]. Im Nachfolgenden transformieren die Vesikel in unterschiedliche intrazelluläre Vesikel, wie späte Endosomen oder Lysosomen [160]. Die klassischen frühen Endosomen können über die Marker EEA1 oder Rab5 identifiziert werden [161, 162]. Da frühe Endosomen aufgrund vieler unterschiedlicher Aufnahmewege entstehen können, eignen sie sich für die Überprüfung, ob Nanopartikel über endozytotische Aufnahmewege aufgenommen werden.

Eine Antikörperfärbung gegen das Protein Rab5 wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Blockcopolymere nach der Aufnahme in frühen Endosomen befinden. Da sich die frühen Endosomen direkt nach der Aufnahme ausbilden, wurde die Inkubationszeit der Blockcopolymere auf 3 Stunden reduziert.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse abgebildet. In der ersten Zeile (a bis c) ist die Anti-Rab5-Färbung mit dem Blockcopolymer-TPP dargestellt. Die zweite Zeile (d bis f) stellt die Anti-Rab5-Färbung mit dem Blockcopolymer ohne TPP dar. In den Abbildungen g) ist die Negativkontrolle der Rab5-Färbung und in h) die Sekundärantikörper Kontrolle dargestellt. Bei beiden Blockcopolymeren war keine Kolokalisation mit Rab5 zu erkennen. Das ließ die Vermutung zu, dass die Blockcopolymere nicht über endozytotische Aufnahmeweg aufgenommen wurden. Dieses Ergebnis unterstützte die Erkenntnisse, die bei den Experimenten mit Transferrin und Dextran gemacht wurden.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

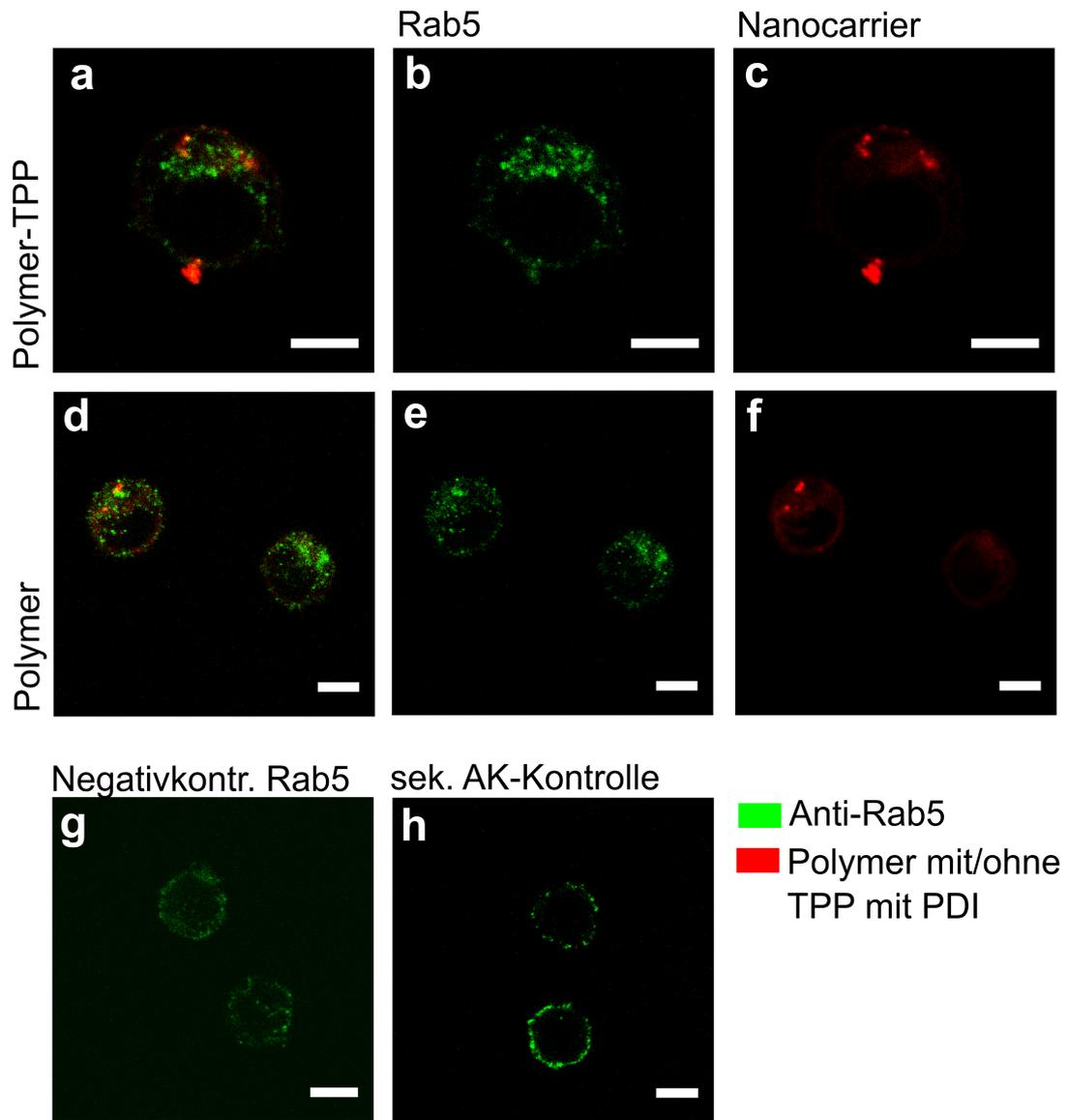


Abbildung 23: CLSM Aufnahmen während der Aufnahme von a) bis c) Polymer-TPP und d) bis f) Polymer ohne TPP in CD8⁺ T-Zellen. Die frühen Endosomen wurden mittels Anti-Rab5 Antikörper und Anti-mouse AlexaFluor 488 Sekundärantikörper markiert. Beide Polymere sind mit dem Farbstoff PDI kovalent gekoppelt. Die Inkubation von Polymer vor der Antikörperfärbung betrug 3 Stunden. Bei beiden Proben war keine Kolo-kalisation mit den frühen Endosomen erkennbar. g) als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Polymer verwendet. h) Sekundärantikörper Kontrolle. Maßstabsbalken 5 μm.

3. Ergebnisse und Diskussion

Offen bleibt somit die Frage, wie die Blockcopolymere in CD8⁺ T-Zellen aufgenommen werden. Eine weit diskutierte und immer mehr an Interesse gewinnende Möglichkeit stellt direkte Translokation über die Zellmembran dar [19]. Die direkte Translokation wird oft im Zusammenhang mit zellpenetrierende Peptiden (engl. *cell penetrating peptides*, CPPs) beschrieben [163]. Dabei handelt es sich um Peptide, die aufgrund ihrer Eigenschaften die Zellmembran durchwandern können ohne dafür spezifische Rezeptoren oder Proteine zu verwenden. Dabei können die CPPs bioaktive Moleküle, wie Proteine, Peptide oder Oligonukleotide in die Zelle transportieren und eignen sich sehr gut als *Drug Delivery System* [52]. Anhand von biophysikalischen Studien wurden drei möglichen Mechanismen beschrieben, die bei der direkten Translokation möglich sind. So gibt es neben den elektrostatischen Wechselwirkungen, die unspezifische Endozytose oder die Ausbildung von inversen Micellen, die zur Translokation der CPPs führen [53, 164, 165]. In Abbildung 24 sind die drei Wege schematisch dargestellt.

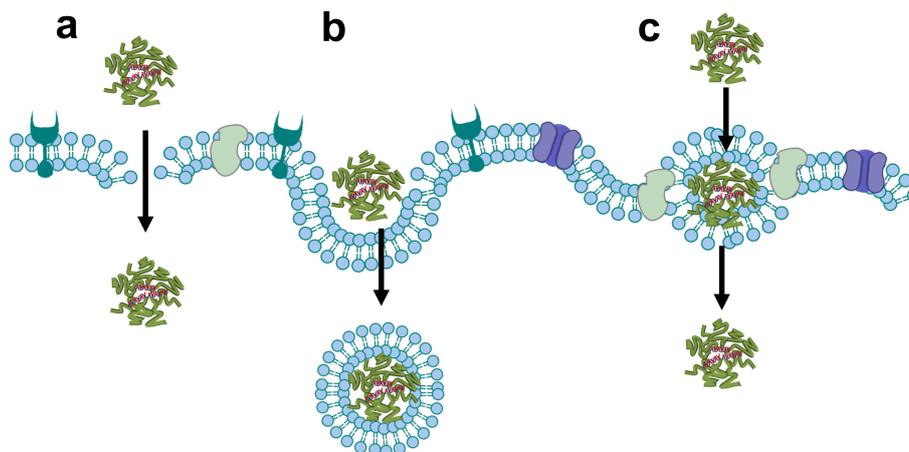


Abbildung 24: Schematische Darstellung der direkten Translokation über a) elektrostatische Wechselwirkungen der CPPs mit den Phospholipiden der Zellmembran, b) unspezifische Endozytose und c) inversen Micellen, die sich in der Zellmembran ausbilden und das CPP umgeben. Modifiziert nach [53].

Da für die Blockcopolymere keine Hinweise für einen endozytotischen Aufnahme-mechanismus gefunden wurden, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Blockcopolymere ähnlich wie die CPPs in Zellen aufgenommen wurden. Besonders nahe-

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

liegend scheinen die elektrostatischen Wechselwirkungen und inversen Micellen zu sein. Blockcopolymer besaßen eine kationische Ladung, die u. a. für die Komplexierung von siRNA verantwortlich war. Deshalb könnte diese kationische Ladung, über elektrostatische Wechselwirkungen, auch die Translokation über die Zellmembran ermöglicht haben. Dass die elektrostatische Wechselwirkung für eine passive Zellaufnahme ausreichend ist und dabei die Zellmembran nicht irreversibel geschädigt wird, konnte schon gezeigt werden [50]. Die inversen Micellen könnten als Aufnahmeweg nicht ausgeschlossen werden, jedoch müsste in weiteren Studien untersucht werden, ob die Blockcopolymer aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften geeignet sind, um mit der Zellmembran inverse Micellen zu bilden. Die unspezifische Endozytose konnte als möglicher Aufnahmeweg nicht mit absoluter Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Jedoch sprechen die bisherigen Ergebnisse gegen eine endozytotische Aufnahme. Zusammenfassend ist in Abbildung 25 der wahrscheinlichste Aufnahmeweg, über elektrostatische Wechselwirkungen, dargestellt.

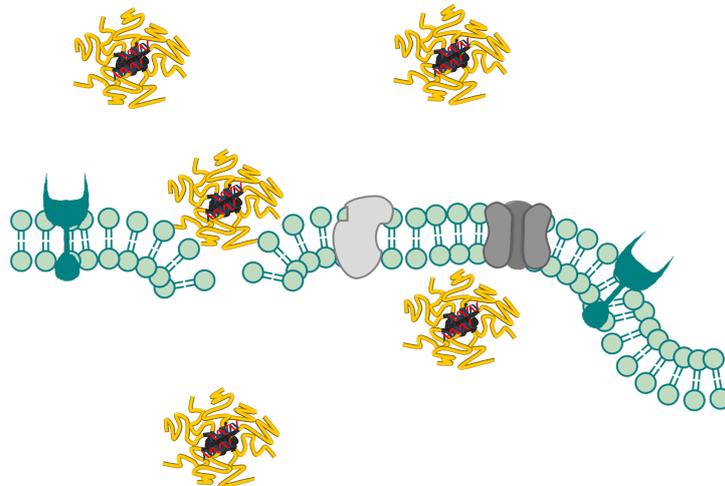


Abbildung 25: Schematische Darstellung der direkten Translokation der Blockcopolymer über die Zellmembran. Blockcopolymer sind als Komplexe mit siRNA dargestellt. Die Zellmembran ist mit Proteinen und Rezeptoren dargestellt. Die leicht kationischen Blockcopolymer treten in Interaktion mit den anionischen Phospholipiden der Zellmembran und durchwandern die Zellmembran ohne endozytotischen Mechanismen. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Kolokalisation mit Lysosomen

Die Lysosomen sind die terminalen Vesikeln bei endozytotischen Aufnahmewegen und für den Abbau von Substanzen und zellulären Bestandteilen verantwortlich. Ermöglicht wird das durch den niedrigen pH-Wert und eine Vielzahl an Hydrolasen [166]. Bekannterweise lassen sich nach 24 Stunden die meisten Nanopartikel im Lysosomen nachweisen. Um zu zeigen, dass sich die Blockcopolymeren nach 24-stündiger Inkubation im Lysosomen befinden, wurde ein Kolokalisationsexperiment durchgeführt. Dabei wurden die Lysosomen mit dem Farbstoff *LysoTracker green* markiert und nach der Inkubation mit Blockcopolymeren im cLSM analysiert. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse abgebildet. In a) bis c) ist die Negativkontrolle und in d) bis i) Blockcopolymeren-TPP. Da längerfristig nur das Interesse an dem Blockcopolymer-TPP bestand, weil diese besser in CD8⁺ T-Zellen aufgenommen wurden, wurde der Versuch nicht für das Blockcopolymer ohne Modifizierung durchgeführt. In den Bildern d) und g) ist eine deutliche Kolokalisation zwischen dem Blockcopolymer und den Lysosomen zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Blockcopolymeren nach 24 Stunden Inkubation im Lysosomen befinden. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis sein, dass ein Teil der Blockcopolymeren über eine unspezifische Endozytose aufgenommen wurden. Denn erwartungsgemäß lassen sich endozytotisch aufgenommene Substanzen nach gewisser Zeit im Lysosomen nachweisen. Weiterhin ist bekannt, dass andere intrazelluläre Vesikel mit Lysosomen verschmelzen können [66]. Das wiederum könnte für eine Aufnahme über inverse Micellen sprechen, da diese intrazellulär mit Lysosomen verschmelzen könnten. So würden die Blockcopolymeren in einer Art Vesikel intrazellulär vorliegen, welches jedoch nicht zur Familie der endozytotischen Vesikel gehört, aber trotzdem früher oder später mit Lysosomen verschmelzen kann.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

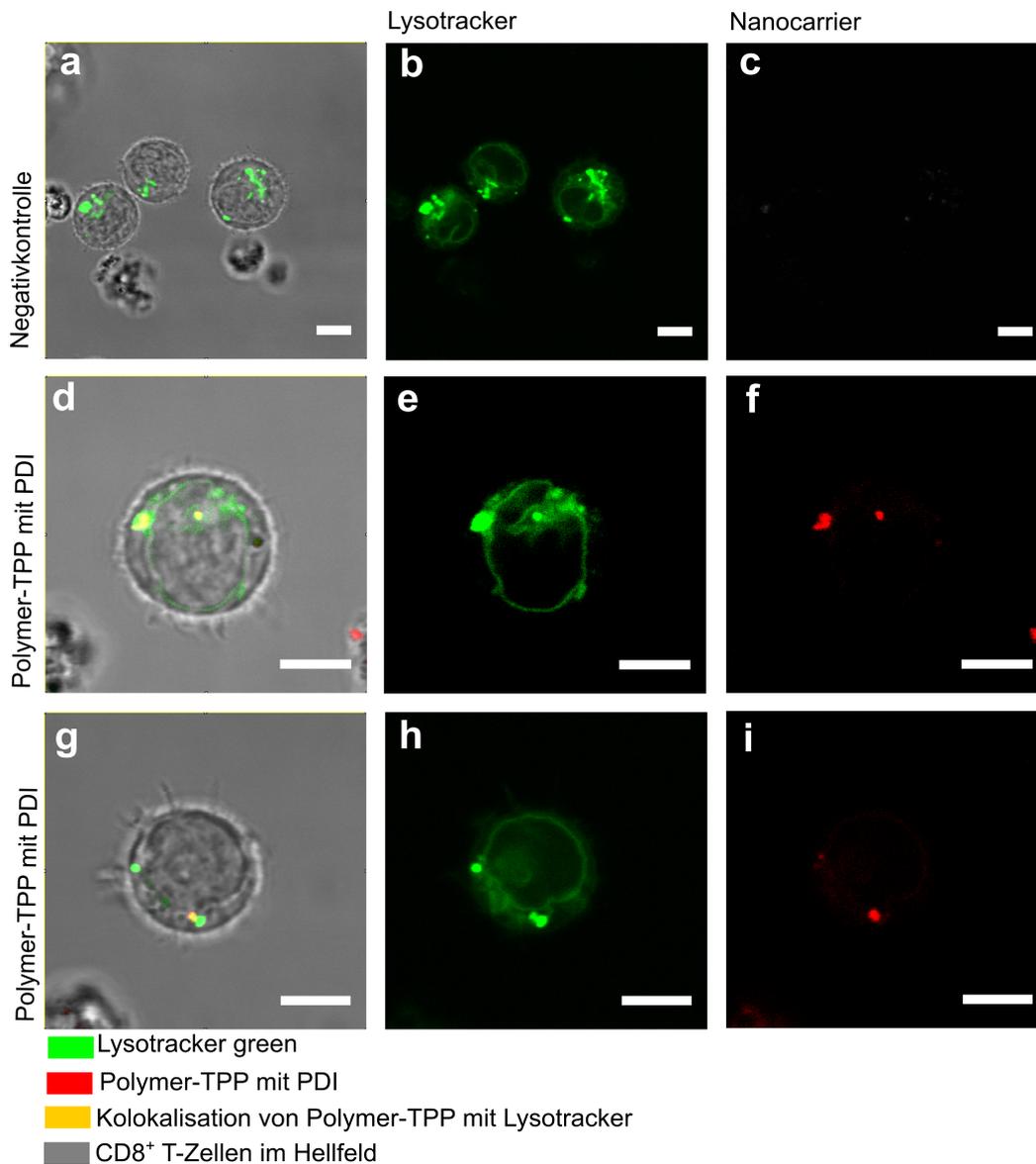


Abbildung 26: CLSM Kolokalisationsaufnahmen der Polymere mit/ohne TPP und der Lysosomen in CD8⁺ T-Zellen. Inkubationszeit der Polymere mit T-Zellen betrug 24 Stunden, anschließend wurden die Lysosomen mittels *LysoTracker* Farbstoff angefärbt. a) bis c) Negativkontrolle ohne Polymerzugabe. d) bis f) Polymer-TPP mit PDI Probe. Kolokalisation mit Lysosomen erkennbar. g) bis i) Polymer mit PDI Probe. Ebenfalls Kolokalisation mit Lysosomen vorhanden. *LysoTracker* färbt unspezifisch Nukleusmembran der T-Zellen an. Aufnahmen als *Live cell-imaging* aufgenommen. Maßstabsbalken 5 μm .

3.1.6. Kollokalisationsstudien zur Aufnahme von siRNA-Blockcopolymer-Komplexe in CD8⁺ T-Zellen

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, eignen sich die Blockcopolymeren als Trägersystem für siRNA. Die Fähigkeit siRNA zu komplexieren und das optimale Verhältnis zwischen siRNA und Blockcopolymer wurde mittels EMSA ermittelt. Somit wurde von chemischer Seite her nachgewiesen, dass die Blockcopolymeren und die siRNA als Komplexe vorlagen [32]. Jedoch unterlagen die Komplexe unterschiedlichen Einflüssen (Proteine, pH-Wert, Salze) in den biologischen Systemen. Deshalb sollte mit einem Kollokalisationsexperiment gezeigt werden, dass die siRNA-Blockcopolymer-Komplexe auch in biologischen Systemen vorhanden waren.

Denn für spätere Knockdown-Experimente ist der zuverlässige Transfer von intakter siRNA in die Zellen essentiell. Für dieses Experiment wurde mit PDI markiertes Block-co-polymer-TPP und Atto488 gelabelte siRNA verwendet. Für dieses Experiment wurden *z-Stacks* angefertigt. Damit konnten Aufnahmen der Zellen in *z*-Ebene angefertigt werden und das wiederum konnte für eine 3D-Darstellung genutzt werden. Weiterhin waren *z-Stacks* ein sehr gutes Werkzeug, um Nanopartikel innerhalb der Zelle nachzuweisen. In Abbildung 27 ist das Prinzip der *z-Stack*-Anfertigung dargestellt. Hierbei sind die einzelnen *z*-Ebenen in schwarz, blau, grün, orange und rot dargestellt. Neben der 3D-Darstellung ist auch die 2D-Darstellung gezeigt.

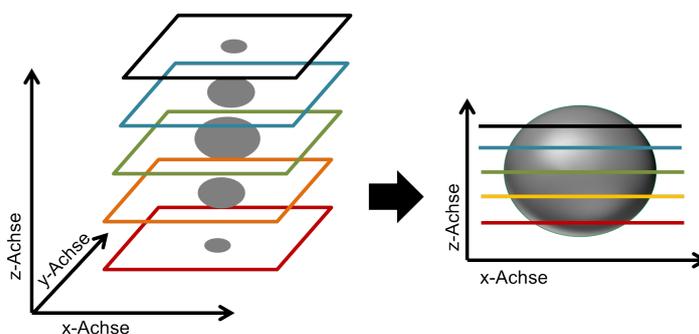


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Prinzips des *z-Stacks*. Die Anfertigung von Aufnahmen unterschiedlicher *z*-Ebenen ermöglicht die 3D Rekonstruktion einer Zelle. Die unterschiedlichen Ebenen sind in schwarz, blau, grün, gelb und rot dargestellt. Das Objekt durch welches die *z-Stacks* angefertigt wurden ist in grau dargestellt.

3.1. Blockcopolymer (HPMA-s-APMA)-b-GPMA zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Zellen sind im Hellfeld, das Blockcopolymer in rot und die siRNA in grün abgebildet. Besteht eine Kolokalisation zwischen Blockcopolymer und siRNA entsteht ein gelbes Signal. Insgesamt wurden 26 z-Ebenen aufgenommen, von denen die Ebenen 8, 11, 13, 16, 19 und 24 dargestellt sind. Die Ebenen 8 und 24 zeigen obere und untere Zelloberfläche der Zellen, während die Ebenen dazwischen das Innere der Zelle mit Zellkern, Organellen und Zytoplasma zeigen.

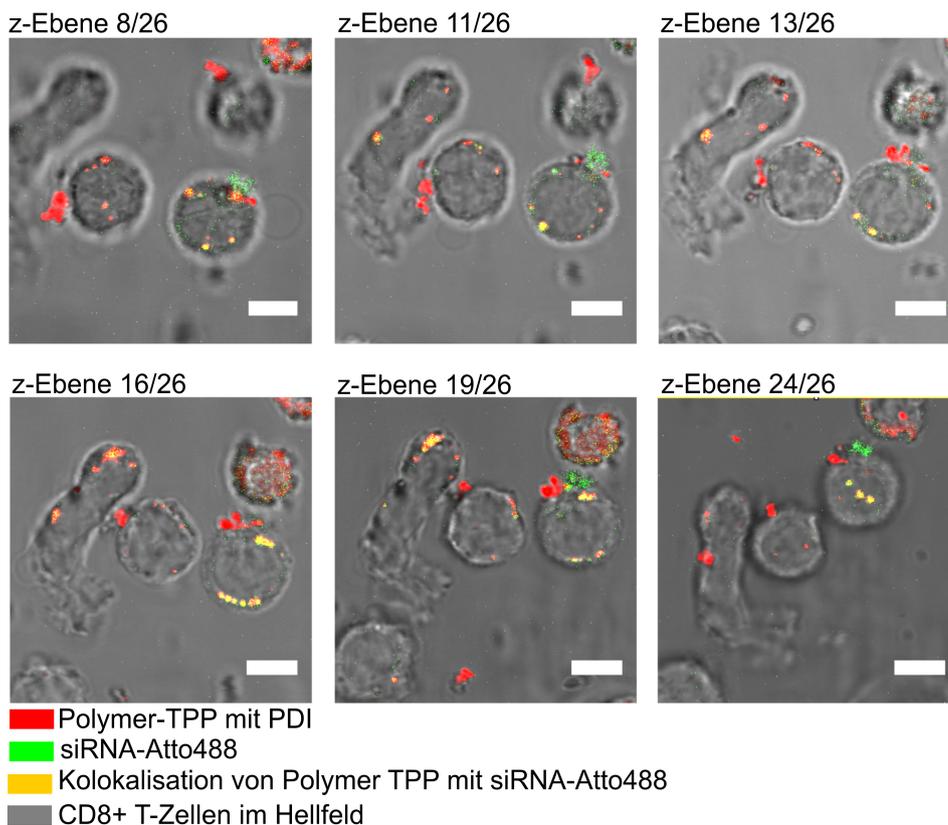


Abbildung 28: CLSM Aufnahmen der Zellaufnahme von Polymer-TPP-siRNA-Komplexen in CD8⁺ T-Zellen. Die Aufnahmen wurde als Serie aus 26 Einzelbilder durch z-Ebene angefertigt. Dargestellt sind die Ebenen 8, 11, 13, 16, 19, und 24. Die Ebenen 8 und 24 repräsentieren die untere und obere Zelloberfläche. Die Ebenen 11, 13, 16 und 19 das Zellinnere. Bei den Ebenen 11, 13, 16 und 19 ist zu erkennen, dass sich die Polymer-siRNA-Komplexe innerhalb der Zellen, im Zytoplasma befinden. Die Kolokalisation (in gelb dargestellt) von Polymer und siRNA zeigt, dass die siRNA tatsächlich durch das Polymer komplexiert und in die Zellen transportiert wurde. Das rote Signal deutet darauf hin, dass das Polymer auch ohne siRNA Komplexe gebildet hat. Das gelbe Signal deutet auf eine Akumulation von siRNA an der äußeren Zellmembran hin. In den Ebenen 8 und 24 ist zu erkennen, dass sich auch auf der äußeren Zellmembran Komplexe befinden. Maßstabsbalken 5 μ m.

In allen z-Ebenen war ein Kollokationssignal zu erkennen, das bedeutet, dass die siRNA und Blockcopolymere als Komplexe in die Zellen aufgenommen wurden. Weiterhin ist zu erkennen, dass Blockcopolymere teilweise ohne siRNA Komplexe bildeten (rotes Signal). Diese Eigenschaft Aggregate zu bilden ist bekannt und bei vielen Nanomaterialien vorzufinden. Interessant und wichtig für spätere Knockdown Experiment war, dass innerhalb der Zelle Signal von siRNA und Blockcopolymer detektiert wurde.

Die Herausforderung bestand darin, das Signal der siRNA zu detektieren, da das Blockcopolymer die Eigenschaft hatte andere Fluoreszenzen zu quench (nicht publizierte Daten von Ilja Tabujew). Weiterhin kamen pro siRNA viele Moleküle an gelabeltem Blockcopolymer, somit war das Signal der Blockcopolymere um ein Vielfaches höher.

3.2. Kationische Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA

Basierend auf den Erkenntnissen aus den Experimenten mit den Blockcopolymeren sollten weitere Nanomaterialien für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Die Nanohydrogele, die zu allererst von Lutz Nuhn *et al.* beschrieben wurden, wiesen gewisse Charakteristika (Größe, kationische Ladung, Fähigkeit siRNA zu komplexieren) auf, die sie für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen interessant machten [31]. Bei den eingesetzten kationischen Nanohydrogele handelte es sich um amphiphile Reaktivester-Blockcopolymere, die zur Selbstorganisation (engl. *self-assembly*) neigten. Die Idee, Nanohydrogele als Trägersystem für siRNA in die Zelle zu verwenden wurde von Lutz Nuhn *et al.* beschrieben; der mögliche Mechanismus ist in Abbildung 29 dargestellt. Es wird vermutet, dass die Nanohydrogele nach dem Eintritt in die Zelle durch das saure Milieu leicht quellen und dadurch ein Anionenaustausch stattfinden kann, welcher wiederum zur Freisetzung der siRNA führt [124].

Die Synthese des Blockcopolymers wurde von Nadine Leber (AG Zentel) durchgeführt. Die Herstellung und Synthese der kationischen Nanohydrogele wird in 1.7.2 erläutert. Nachfolgend werden die Ergebnisse mit den Nanohydrogelen beschrieben und diskutiert.

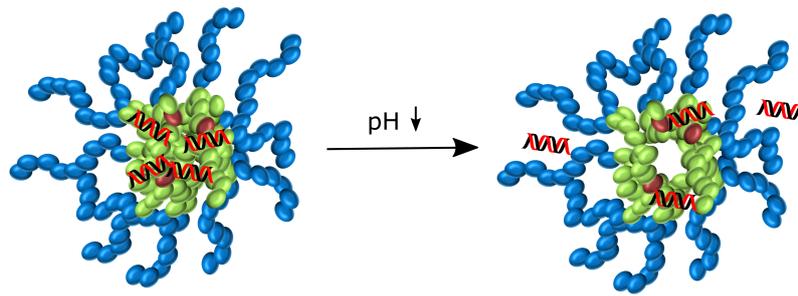


Abbildung 29: Schematische Darstellung der möglichen Freisetzung von siRNA aus den Nanohydrogelen. Vermutet wird, dass durch Absenken des pH-Werts ein Austausch mit anderen Polyanionen statt findet und somit die siRNA frei gesetzt wird. Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

3.2.1. Biokompatibilität der Nanohydrogele

Die Biokompatibilität der Nanohydrogele wurde in früheren Studien an Krebszelllinien untersucht [68, 140].

Jedoch ist bekannt, dass jede Zellart unterschiedlich empfindlich ist und ein besonders großer Unterschied ist zwischen primären Zellen und Zelllinien, die aus Krebszellen generiert wurden, zu erwarten. Deshalb sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Nanohydrogele auch bei primären humanen CD8⁺ T-Zellen die metabolische Aktivität nicht beeinflusste. Dafür wurde ein MTS-Assay mit unterschiedlichen Nanohydrogelkonzentrationen durchgeführt. Die Nanohydrogele wurden unkomplexiert eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Als Negativkontrolle dienten unbehandelte CD8⁺ T-Zellen, als Positivkontrolle dienten T-Zellen, die mit 5% DMSO versetzt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu 300 $\mu\text{g/ml}$ Nanohydrogel keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen besitzen. Für alle Konzentrationen war eine metabolische Aktivität von über 80% zu erkennen. Anhand der metabolischen Aktivität können Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden, da ein toxisches Material die Zellen absterben lässt und somit auch die metabolische Aktivität vermindert. Das ist anhand der Positivkontrolle zu erkennen, hier wurden die Zellen vorsätzlich mit der zytotoxischen DMSO-Lösung versetzt, um eine verminderte metabolische Aktivität zu erhalten.

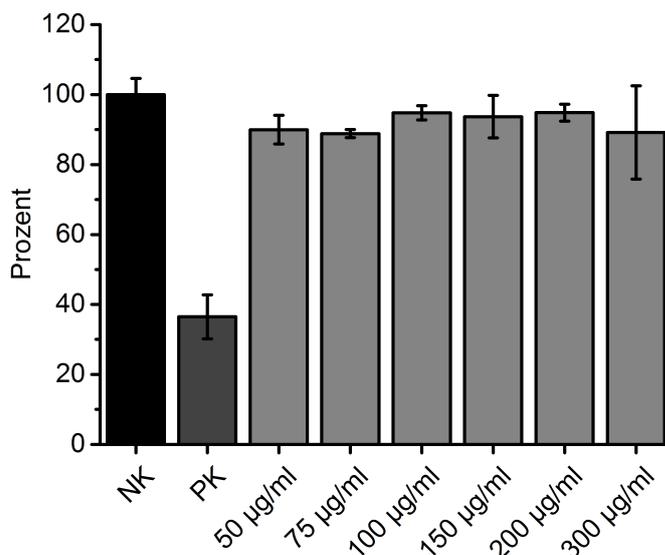


Abbildung 30: Die Ermittlung der metabolischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50, 75, 150, 200 und 300 µg/ml unkomplexierten Nanohydrogelen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und als Positivkontrolle mit 5% DMSO behandelte Zellen. Die metabolische Aktivität wurde auf die Negativkontrolle normiert.

In einer Studie mit einer Luciferase-modifizierten HeLa-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass die Nanohydrogele bis zu einer Konzentration von 56 µg/ml über einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden nicht toxisch sind [68]. Die hier eingesetzten Konzentrationen lagen weit unter den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen. Deshalb war es nicht überraschend, dass die Nanohydrogele keine Zytotoxizität für HeLa-Zellen aufwiesen. Weiterhin erlaubten diese Ergebnisse keine Rückschlüsse über eine mögliche Zytotoxizität bei primären Zellen, da dafür die Konzentrationen zu gering waren.

3.2.2. Aufnahmestudien der Nanohydrogele in CD8⁺ T-Zellen

Um sicherzustellen, dass es sich bei der Aufnahme um Nanohydrogele handelt, wurden Fluoreszenzaufnahmen mit freiem Alexa Fluor[®]647-Cadaverine-Farbstoff angefertigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 gezeigt. Verglichen wurden die Aufnahme von a) freiem Farbstoff, d) unkomplexierte Nanohydrogele und g) Nano-

hydrogele mit siRNA (40:1) komplexiert in CD8⁺ T-Zellen. Zu erkennen ist, dass der freie Farbstoff ein komplett anderes Färbemuster aufwies als die Nanohydrogele. Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass bei den Nanohydrogelen es zu einer unspezifischen Färbung durch *CellMask green* Membranfarbstoff kam, jedoch nicht bei der Probe mit dem freien Farbstoff. Somit ließ sich rückschließen, dass die Nanohydrogele 'proteinähnliche' Strukturen hatten, die zur Bindung des *CellMask green* Farbstoffes führte. Weiterhin zeigten die Ergebnisse deutlich, dass tatsächlich die Nanohydrogele aufgenommen wurden und nicht nur der Farbstoff.

Die Nanohydrogele besaßen ein kationisches Zeta-Potential, über dieses war die Komplexierung der siRNA durch elektrostatische Wechselwirkungen möglich [31]. Jedoch ist bekannt, dass kationische Nanomaterialien Endozytose-unabhängig in Zellen aufgenommen werden können [167, 50, 19, 168]. Deshalb soll mit den nächsten Experimenten untersucht werden, ob die kationische Gesamtladung einen Einfluss auf die Aufnahme der Nanohydrogele in CD8⁺ T-Zellen hat. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Aufnahme von Nanohydrogele in CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometer dargestellt. Dafür wurde der MFI des Alexa Fluor[®] 647-Cadaverine Farbstoffes quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen ohne Nanohydrogel, um eine Eigenfluoreszenz auszuschließen. Da die Nanohydrogele kationisch geladen waren, enthielt unkomplexiertes Nanohydrogel das größte kationische Zeta-Potential. Umso kleiner das Verhältnis zwischen siRNA zu Nanohydrogel war, umso geringer war folglich das kationische Zeta-Potential. Um das optimale Komplexierungsverhältnis von siRNA zu Nanohydrogelen zu ermitteln, wurde ein EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*) von Nadine Leber durchgeführt. Optimal bedeutet, das Zeta-Potential war beinahe neutral und es lag keine freie siRNA mehr vor. Für das in dieser Arbeit verwendete Polymer lag das Verhältnis siRNA zu Nanohydrogel bei 1:20. Zu erkennen ist, dass ein neutrales Zeta-Potential (NL119/siRNA 20:1) die Aufnahme der Komplexe in die CD8⁺ T-Zellen erhöhte. Während unkomplexiertes Nanohydrogel (NL119) und die Probe NL119/siRNA 80:1 am schlechtesten aufgenommen wurden. Jedoch war die Aufnahme NL119/siRNA 80:1 signifikant höher verglichen mit unkomplexiertem Nanohydrogel. Weiterhin war die Aufnahme der Proben NL119/siRNA 20:1 und 40:1 signifikant höher verglichen mit unkomplexiertem Nanohydrogel. Das getestete Signifikanzniveau lag bei $p < 0,01$.

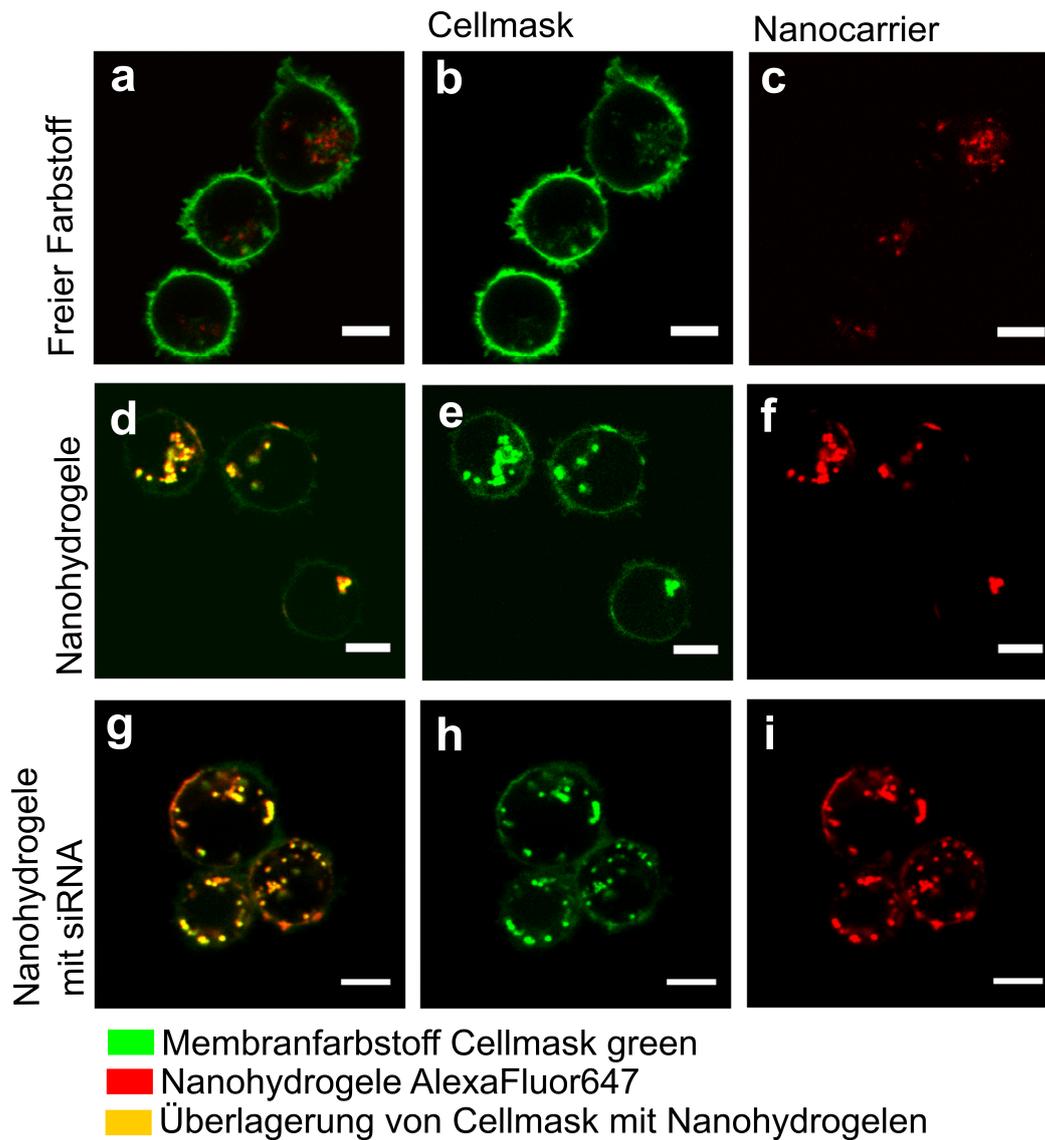


Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahmen nach Aufnahme von unkomplexierten und mit siRNA komplexierten Nanohydrogelen und freiem AlexaFluor® 647 Cadaverine Farbstoff in CD8⁺ T-Zellen. a) bis c) Aufnahme von freiem AlexaFluor® 647 Cadaverine Farbstoff. d) bis f) unkomplexiertes Nanohydrogel. g) bis i) komplexiertes Nanohydrogel im Gewichtsverhältnis siRNA zu Nanohydrogel 1 : 40. a) Färbemuster des freien Farbstoffs AlexaFluor® 647 Cadaverine. d) und g) Überlagerung des *CellMask* Farbstoff mit den Nanohydrogele durch unspezifische Färbung des *CellMask* Farbstoffes. Bei allen drei Proben ist eine Aufnahme in die Zellen zu sehen. Das Färbemuster des freien Farbstoffes (a)) unterscheidet sich von dem der Nanohydrogele (d) und g)). Maßstabsbalken 5 μ m.

3.2. Kationische Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben war nicht enorm, jedoch war trotzdem eine Tendenz erkennbar. Entgegen der Annahme, dass kationische Nanomaterialien besser aufgenommen werden, zeigten diese Experimente, dass Nanohydrogele mit einem relativ neutralen Zeta-Potential (NL119/siRNA 1:20) am besten von CD8⁺ T-Zellen aufgenommen wurden. Um eine gute Aufnahme zu erhalten reichte eine leichte kationische Gesamtladung offensichtlich aus.

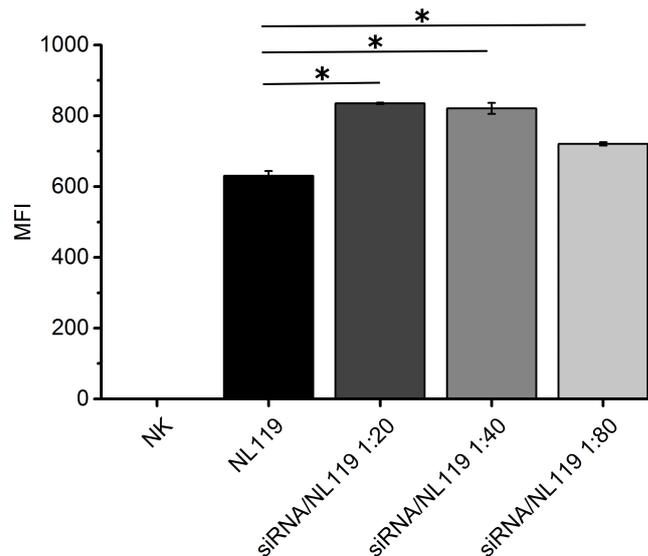


Abbildung 32: Quantifizierung der Nanohydrogelaufnahme im Durchflusszytometer mittels mittlerer Fluoreszenzintensität (engl. mean fluorescence intensity, MFI). Gemessen wurde die Aufnahme von unkomplexiertem Nanohydrogel und mit siRNA komplexiertem Nanohydrogel in CD8⁺ T-Zellen. Die Komplexierung erfolgte im Gewichtsverhältnis siRNA zu Nanohydrogel 1 : 20, 1 : 40 und 1 : 80. Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Zellen. Die Aufnahme der komplexierten Nanohydrogele ist signifikant ($p < 0,01$) höher als bei den unkomplexierten Proben.

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, können Nanopartikel die Zellmembran unspezifisch penetrieren, d.h. es werden keine spezifischen Rezeptoren, Proteine oder endozytotische Aufnahmemechanismen benötigt [19]. Dieser Aufnahmeweg ist charakteristisch für kationische Nanopartikel, wie die CPPs. Da sowohl die Blockcopolymere als auch die Nanohydrogele eine kationische Ladung besaßen, wurde vermutet, dass diese über die gleichen Mechanismen aufgenommen wurden. In Abbildung 33 sind die beiden Aufnahmemechanismen beispielhaft für die Nanohydrogele dargestellt. Die Aufnahmeprozesse in CD8⁺ T-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht nä-

3. Ergebnisse und Diskussion

hers untersucht. Da es jedoch in der Literatur kaum Hinweise auf endozytotische Mechanismen in T-Zellen gibt, unterstützt das die Vermutung, dass T-Zellen hauptsächlich unspezifisch oder über direkte Translokation Nanopartikel aufnehmen können. Das wiederum deckt sich mit den Beobachtungen, die in dieser Arbeit gemacht wurden. (siehe Kapitel 3.1 und Kapitel 3.4).

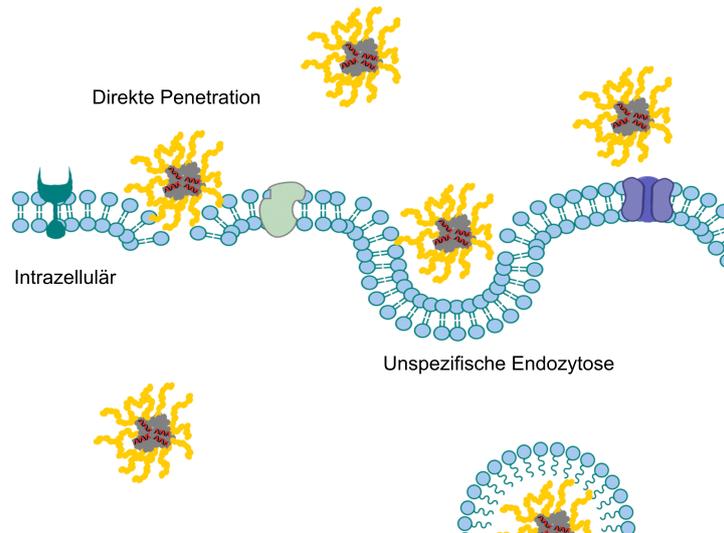


Abbildung 33: Schematische Darstellung des möglichen Aufnahmemechanismus von kationischen Nanopartikeln in Zellen. Aufgrund der kationischen Ladung ist eine direkte Translokation und/oder eine unspezifische Endozytose als Aufnahmeweg möglich. In blau dargestellt die Zellmembran mit Proteinen, Kanälen und Rezeptoren. In gelb/grau dargestellt die Nanopartikel mit siRNA. Adaptiert nach [50].

Für die Bestätigung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse wurde die Aufnahme der Nanohydrogele nochmals im cLSM analysiert. Hier sollte vor allem bestätigt werden, dass sich die Proben in der Zelle befinden und nicht an der Oberfläche außerhalb. Diese Frage blieb bei der Messung im Durchflusszytometer unbeantwortet. In Abbildung 34 sind die Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Gezeigt sind die Verhältnisse a) siRNA zu Nanohydrogel 1:20, d) siRNA zu Nanohydrogel 1:40 und g) siRNA zu Nanohydrogel 1:80. Bei allen drei Proben ist zu erkennen, dass sich die Komplexe in den Zellen befanden. Weiterhin ist zu sehen, dass der *CellMask green* Farbstoff unspezifisch die Nanohydrogele anfärbte.

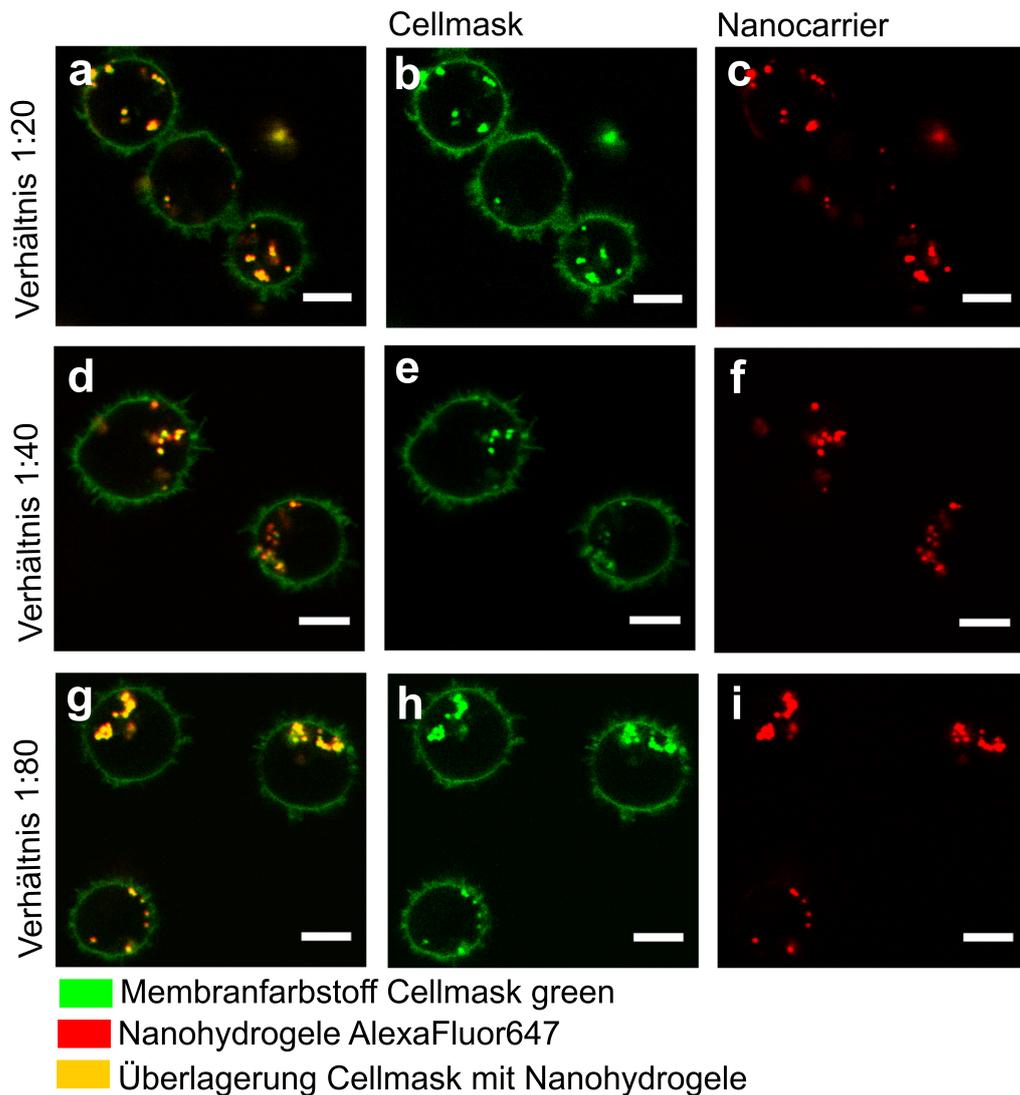


Abbildung 34: Fluoreszenzaufnahmen nach Aufnahme von unterschiedlichen siRNA-Nanohydrogel-Komplexen in CD8⁺ T-Zellen. a) bis c) Gewichtsverhältnis siRNA zu Nanohydrogel 1 : 20. d) bis f) Gewichtsverhältnis siRNA zu Nanohydrogel 1 : 40. g) bis i) Gewichtsverhältnis siRNA zu Nanohydrogel 1 : 80. a), d) und g) Überlagerung des *CellMask* Farbstoff mit den Nanohydrogele durch unspezifische Färbung des *CellMask* Farbstoffes. Bei allen drei Proben ist eine Aufnahme in die Zellen zu sehen. Die kationische Eigenschaft des Nanohydrogeles nimmt mit zunehmendem siRNA-Anteil ab.

3.2.3. Zeitkinetik der Aufnahme von Nanohydrogelen in CD8⁺ T-Zellen

Die Aufnahmegeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Proteinkonzentrationen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dafür wurde der MFI der Proben über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse dargestellt. Abgebildet in dunkelgrau ist die Zeitkinetik der Aufnahme für Proben mit 100% FBS im Medium. Hier zeigte sich die geringste Aufnahme über alle Zeitpunkte. Zu erklären ist das mit dem hohen Gehalt an Proteinen im Medium, die entweder eine dichte Schicht um die Zellen bildeten oder die siRNA-Nanohydrogelkomplexe ummantelte, sodass die Aufnahme deutlich reduziert war. In hellgrau dargestellt sind die Proben mit 2% FBS im Medium. Hier zeigte sich nur eine geringe Erhöhung der Aufnahme über die Zeit und stellte somit keinen Vorteil gegenüber dem Medium mit 10% FBS dar. Ein FBS Gehalt von 10% gilt als Standardproteingehalt für die Kultivierung von zyotoxischen T-Zellen in RPMI-1640 Medium. Und da es sich um primäre Zellen handelt, ist der komplette Entzug von FBS Proteinen im Medium ungeeignet, da diese sehr schnell ihre Viabilität verlieren würden. Weiterhin soll die Orientierung dieses Projektes in Richtung *in vivo* Studien gehen und deshalb waren Experimente ohne FBS-Proteine nicht relevant. In allen drei Fällen zeigte sich innerhalb der ersten 30 Min die höchste Aufnahme von Nanohydrogel-Komplexen. Bei 2% und 10% FBS Proben gab es zwischen einer Stunde und drei Stunden Inkubationszeit nochmals einen deutlichen Anstieg in der Aufnahme. Zusammenfassend zeigte sich, dass 2% FBS im Medium keinen Vorteil gegenüber 10% FBS hatte, da bei 2% FBS die Aufnahme nur geringfügig höher war, aber die Viabilität der Zellen deutlich schlechter war. Gleichzeitig waren 3 Stunden Inkubation bei 2% oder 10% FBS ausreichend, um eine hohe Aufnahme an Nanohydrogelen zu erzielen.

Eine quantitative Auswertung der Aufnahme von Nanohydrogelen wurde in früheren Studien nie durchgeführt. Jedoch gibt es Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Hierbei war erkennbar, dass schon nach 30 Min Nanohydrogele aufgenommen wurden und nach 24 Std ein Großteil der Nanohydrogelen in Lysosomen lokalisiert waren [68]. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Nanohydrogele zelltypunabhängig sehr schnell aufgenommen wurden.

3.2. Kationische Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA

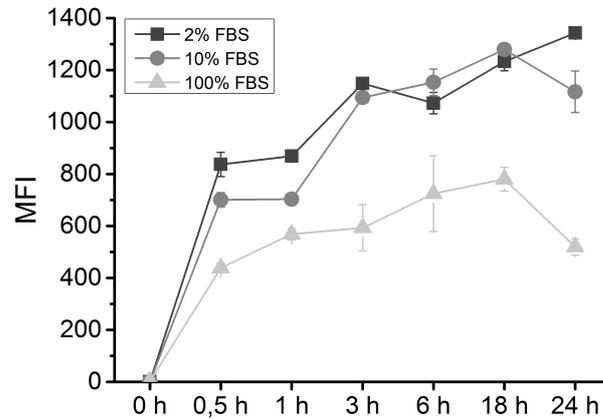


Abbildung 35: Quantifizierung der Nanohydrogelaufnahme im Durchflusszytometer mittels MFI. Gemessen wurde die Aufnahme von siRNA-Nanohydrogel-Komplexe (1 : 40) in CD8⁺ T-Zellen bei unterschiedlichem FBS-Gehalt im Zellkulturmedium. An den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 18 h und 24 h wurden die Proben fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Wie weiter oben beschrieben, wird die Aufnahme von Nanohydrogelen entscheidend von Proteinen im Medium beeinflusst. So konnte Nuhn *et al.* in einer Studie zum Aggregationsverhalten der Nanohydrogele im Blutserum zeigen, dass das Aggregationsverhalten der Nanohydrogele in Gegenwart von Proteinen verändert war [169]. Interessanterweise zeigten unkomplezierte Nanohydrogele ein höheres Aggregationsverhalten als mit siRNA beladenen Nanohydrogelen. Begründet wurde dies von Nuhn *et al.* mit einem sehr kationischen Zeta-Potential von freiem Nanohydrogel, welches wiederum in Interaktion mit anionischen Proteinen treten konnte. Das führte folglich zur Ausbildung von großen Nanohydrogel-Protein-Aggregaten. Welchen Einfluss die chemischen Eigenschaften von Nanopartikeln auf die Ausbildung einer Proteincorona haben, wird intensiv erforscht. So zeigten u. a. Schöttler *et al.*, dass neben der Ladung auch die Oberflächenfunktionalisierung und Hydrophobizität einen Einfluss auf das Anlagern von Proteinen an der Oberflächen haben [170, 171]. Eine Aggregatbildung der Nanohydrogele mit Proteinen kann durch das Beladen mit siRNA vermindert werden, da dadurch das Zeta-Potential reduziert wird [169]. Bestätigt wird das durch die Beobachtungen, die in dieser Arbeit, zur Aufnahme von Nanohydrogelen gemacht wurden (Abschnitt 3.2.2, Abbildung 32). Auch

hier zeigte sich die geringste Aufnahme bei unkomplexierten Nanohydrogelen, weil vermutlich die Nanohydrogele aufgrund des großen kationischen Zeta-Potential Aggregate mit Proteinen bilden und deshalb schlechter aufgenommen wurden.

3.2.4. Konzentrationskinetik der Aufnahme von Nanohydrogelen in CD8⁺ T-Zellen

Mittels Aufnahmestudien mit unterschiedlichen Nanohydrogel-Konzentrationen konnte die geringste Konzentration ermittelt werden, die zur Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen benötigt wird. Hierfür wurden Nanohydrogele mit siRNA komplexiert und in den Konzentrationen 12,5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 300 $\mu\text{g/ml}$ über 24 Stunden mit CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 abgebildet. In Abbildung 36 a) ist die Quantifizierung der Nanohydrogel-siRNA-Komplexe mittels Durchflusszytometer dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Berechnung des MFI des Alexa Fluor647-Farbstoffes, welcher kovalent an die Nanohydrogele gebunden war. Zu erkennen war eine deutlich Zunahme des MFIs bei den Konzentrationen 12,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 75 $\mu\text{g/ml}$. Von 100 $\mu\text{g/ml}$ bis 300 $\mu\text{g/ml}$ war keine wesentliche Zunahme des MFIs zu erkennen. Somit war bei 100 $\mu\text{g/ml}$ die Sättigungsgrenze bei den CD8⁺ T-Zellen erreicht. In Abbildung 36 b) sind die Fluoreszenzaufnahmen bestimmter Konzentrationen dargestellt. Zu erkennen ist, dass sich die Komplexe überwiegend in der Zellen befanden. Zwischen der 150 $\mu\text{g/ml}$ und 300 $\mu\text{g/ml}$ Probe war kein großer Unterschied zu erkennen. Weiterhin war zu erkennen, dass der *CellMask green* Membranfarbstoff unspezifisch auch an die Nanohydrogele band, deshalb kam es zu dem gelben/orangenem Überlagerungssignal.

Die Nanohydrogele traten offensichtlich schnell in Interaktion mit den CD8⁺ T-Zellen und wurden schon in geringer Konzentration von den T-Zellen aufgenommen. Obwohl die Studienlage zu CD8⁺ T-Zellen überschaubar klein ist, konnte gezeigt werden, dass magnetische Nanopartikel unspezifisch von T-Zellen aufgenommen wurden [150, 144]. Die Größe und Aggregatbildung der Partikel scheinen einen großen Einfluss auf das Aufnahmeverhalten zu haben. So wurden tendenziell kleinere Partikel unabhängig der Konzentration besser aufgenommen als große [144]. Neben dem kationischen Zeta-Potential war die geringe Größe der Nanohydrogele eine wichtige Eigenschaft, die die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen verbesserte. Somit könnte

3.2. Kationische Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA

die geringere Größe der Nanohydrogele ein möglicher Grund sein, warum die Partikel schneller in Interaktion mit den T-Zellen traten als die Blockcopolymeren (siehe Abschnitt 3.1.4).

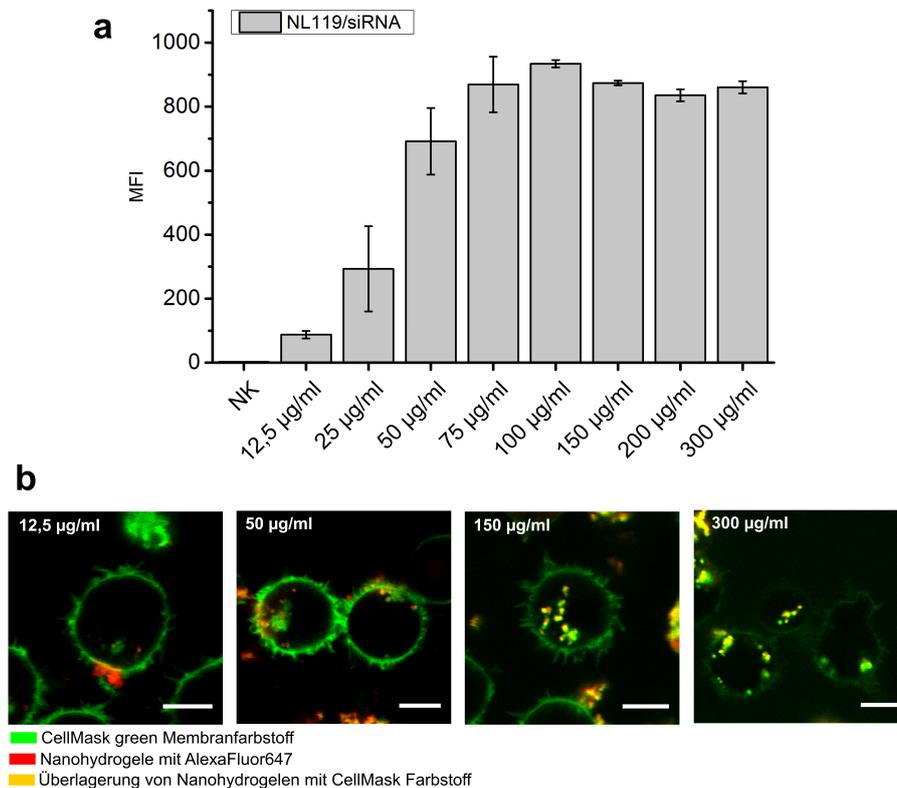


Abbildung 36: Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Nanohydrogelen auf die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen. a) Die Aufnahme wurde quantifiziert mittels Durchflusszytometrie durch Berechnung des MFI des AlexaFluor647 Cadaverine-Farbstoffes. Die Inkubationszeit der Nanohydrogele mit Zellen betrug 18 Stunden. Zu erkennen ist eine anfängliche Zunahme des MFI mit zunehmender Konzentration. Die Sättigungsgrenze ist ab 100 µg/ml zu erkennen und bis zur Konzentration 300 µg/ml ist keine weitere Zunahme des MFI zu erkennen. b) Verifizierung der Aufnahme mittels cLSM Fluoreszenzaufnahmen. Nach 18-stündiger Inkubation der Nanohydrogel-siRNA Komplexe (gelb/orange) wurde die Zellmembran mittels *CellMask green* gefärbt. Zu erkennen ist, dass sich die Nanohydrogele in der Zelle befinden und nicht außerhalb an der Zellmembran. Weiterhin ist deutlich sichtbar, dass schon bei geringen Konzentrationen (12,5 µg/ml, 50 µg/ml) Nanohydrogel in der Zellen erkennbar ist. Maßstabsbalken 5 µm.

3.3. Vergleich Blockcopolymerer und Nanohydrogele als siRNA-Trägersysteme für T-Zellen

In den vorherigen Kapiteln wurden zwei vielversprechende nanodimensionale Trägersysteme für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen vorgestellt und diskutiert. Die beiden Materialien zählten zu den Blockcopolymeren und wurden über die RAFT-Polymerisation hergestellt. Die einen wurden als kationische Blockcopolymerer mit ähnlichen Eigenschaften wie CPPs beschrieben, während die anderen als kationische Nanohydrogele mit Neigung zur Selbstorganisation bezeichnet wurden. Beide Nanomaterialien konnten, aufgrund ihrer kationischen Ladung, über elektrostatische Wechselwirkungen siRNA komplexieren und eigneten sich deshalb als siRNA-Trägersysteme.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Nanomaterialien von zytotoxischen T-Zellen aufgenommen wurden, obwohl die Transfektion von zytotoxischen T-Zellen als sehr kritisch und schwierig angesehen wird [103].

Werden die beiden Nanomaterialien miteinander verglichen so lassen sich diverse Unterschiede erkennen. So zeigten die Ergebnisse, dass die Nanohydrogele schneller (nach 30 Min, Blockcopolymerer nach 6 Std) in Interaktion mit den CD8⁺ T-Zellen traten (siehe Abschnitt 3.1.3 und 3.2.3). Weiterhin war zu erkennen, dass tendenziell bei beiden Materialien die Aufnahme von Proteinen im Zellkulturmedium beeinflusst wurde. Jedoch war der Einfluss auf die Blockcopolymerer scheinbar größer als bei den Nanohydrogelen (siehe Abbildung 18). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Blockcopolymerer ein höheres kationisches Zeta-Potential hatten und dadurch stärker in Interaktion mit den Proteinen im Zellkulturmedium traten [143, 171, 32]. Weiterhin ist bekannt, dass die Größe bei der Aufnahme in T-Zellen einen größeren Einfluss hat als die Konzentration [144]. Deshalb könnte es möglich sein, dass die Blockcopolymerer, die von Haus aus schon größer waren, durch die starke Interaktion mit den Proteinen zu große Aggregate bildeten, die eine Aufnahme in CD8⁺ T-Zelle nicht mehr möglich machten. Denn nach den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen war es sehr wahrscheinlich, dass die CD8⁺ T-Zellen unspezifisch über direkte Translokation die Blockcopolymerer aufnahmen und für diese Aufnahme lag die Größenlimitierung bei 100 nm [19].

Auch bei der Quantifizierung der Aufnahme von unterschiedlichen Konzentrationen

der Nanomaterialien waren Unterschiede vorhanden. So ließ sich bei den Nanohydrogelen ab 100 $\mu\text{g/ml}$ eine Sättigung bei der Aufnahme erkennen, während bei den Blockcopolymeren die Aufnahme gleichmäßig mit der zunehmenden Konzentration anstieg (siehe Abschnitt 3.1.4 und 3.2.4). Somit kann die Aufnahme der Blockcopolymeren evtl. optimiert werden, durch eine höhere Konzentration. Jedoch sollte beachtet werden, dass zu hohe Konzentrationen irgendwann eine toxische Wirkung auf die Zellen haben können. Nichtsdestotrotz konnte bei den Blockcopolymeren über die Konzentration die Aufnahme beeinflusst werden, während das bei den Nanohydrogelen aufgrund der Sättigung nicht funktionierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit beiden Systemen zwei sehr vielversprechende nanodimensionale Trägersysteme für die Aufnahme in CD8^+ T-Zellen gefunden wurde.

3.4. Oberflächenmodifizierung von Ovalbumin Kapseln

Nanokapseln basierend auf Proteinen stellen ein vielversprechendes nanodimensionales Trägersystem für die Zellaufnahme dar, da sie aus körpereigenen Substanzen bestehen und somit eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Weiterhin verfügt die Körperzelle über eine Vielzahl an Proteasen, die effizient die Kapseln abbauen und den Inhalt frei setzen können. Frühere Studien innerhalb der Landfester-Gruppe und Universitätsmedizin Mainz zeigten, dass Ovalbumin-Kapseln biokompatibel und bioabbaubar sind. So konnte Piradashvili *et al.* zeigen, dass Ovalbumin-Kapseln in DCs aufgenommen, abgebaut und der hydrophile Inhalt freigesetzt wurde [33].

Aufgrund dieser vielversprechenden Eigenschaften sollte die Oberfläche der Ovalbumin-Kapseln modifiziert werden, um sie für die Aufnahme in CD8^+ T-Zellen zu verwenden. Die Interleukin-7-Oberflächenmodifizierung sollte eine spezifische, rezeptorvermittelte Aufnahme in T-Zellen gewährleisten. Interleukin-7 (IL-7) kann zytotoxische T-Zellen aktivieren ohne die Hemmung durch regulatorische T-Zellen zu erhöhen [134]. Damit das IL-7 an die Oberfläche der Ovalbumin-Kapseln geklickt werden kann, wurde das IL-7 mit einer Azidgruppe bzw. DBCO-Gruppe versehen. Die Ergebnisse zu den Ovalbumin-Kapseln werden in den folgenden Abschnitten erklärt und diskutiert.

3.4.1. Biokompatibilität der Ovalbumin-IL7-Kapseln

Primäre Zellen, wie die CD8⁺ T-Zellen, reagieren empfindlich auf Einflüsse ihrer Umgebung und deshalb ist die Überprüfung der Zytotoxizität der Ovalbumin-Kapseln gegenüber den T-Zellen notwendig. Dafür wurde ein MTS-Assay, der Auskunft über die metabolische Aktivität der Zellen lieferte, verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Verwendet wurden Ovalbumin-Kapseln mit/ohne IL-7 in den Konzentrationen 75, 150, 300 und 600 µg/ml. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der MTS-Assay durchgeführt. Bei allen Konzentrationen war keine Beeinflussung der metabolischen Aktivität zu erkennen, welche Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu ließ. Somit konnte für alle Proben davon ausgegangen werden, dass sie nicht zytotoxisch waren.

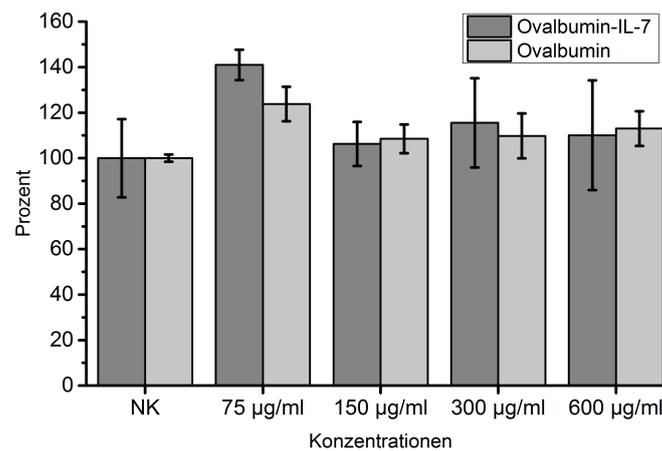


Abbildung 37: Die Ermittlung der metabolischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 75, 150, 300 und 600 µg/ml Ovalbumin-IL-7-Kapseln und Ovalbumin-Kapseln. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die metabolische Aktivität wurde auf die Negativkontrolle normiert. Es konnte keine Zytotoxizität der Ovalbumin-Kapseln auf T-Zellen nachgewiesen werden.

Durch die bekannte gute Verträglichkeit, ist Ovalbumin Bestandteil unterschiedlicher Partikel- bzw. Kapselsystemen [131, 172]. So kann Ovalbumin dendritische Zellen stimulieren oder zum direkten T-Zell-Targeting verwendet werden [33, 173, 40]. Weiterhin konnten humane Albuminkapseln erfolgreich in Tumorzelllinien angereichert werden, um gesunde Zellen zu schützen [172]. Die Modifizierung von Ovalbumin-

Kapseln mit IL-7 wurde in dieser Art noch nicht beschrieben.

3.4.2. Biofunktionalität des IL-7 nach Azid-Modifizierung

Eine Azid-Modifikation ist eine chemische Veränderung des IL-7, die die Struktur wesentlich verändern kann. Daher war die Überprüfung der Biofunktionalität nach der Azid-Modifizierung unerlässlich. Dafür wurde eine murine IL-7-abhängige Zelllinie (2E8 Zellen) verwendet, die nur in Gegenwart von murinem oder humanem IL-7 proliferiert. Die Biofunktionalität wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

Mittels BrdU-Assay (Abbildung 38 a) lässt sich die Proliferation nachweisen, da bei der Zellteilung BrdU, welches analog zu Nukleinbase Thymidin ist, in die DNA eingebaut wird. Durch Quantifizierung des eingebauten BrdU lassen sich Rückschlüsse auf die Biofunktionalität des IL-7 ziehen, da die 2E8-Zellen nur in Gegenwart von intaktem IL-7 proliferieren.

Die *CellTrace Violet* Farbstoffmarkierung der 2E8-Zellen (dargestellt in Abbildung 38 b - e) ermöglichte die Rückverfolgung mehrerer Zellgenerationen durch Farbstoffverdünnung. Dadurch konnte im Durchflusszytometer die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht werden, durch die Abnahme des *CellTrace Violet* Signals. Wenn die IL-7 abhängigen 2E8-Zellen in Gegenwart von IL-7-Azid nach wie vor proliferierten war das der Nachweis, dass das IL-7-Azid trotz Modifikation biofunktional war.

Sowohl die BrdU-Ergebnisse als auch die *CellTrace Violet* Färbung zeigten, dass die Azid-Modifizierung keinen Einfluss auf die biologische Funktionalität des IL-7 hatte. Es ließ sich in beiden Fällen erkennen, dass die 2E8-Zellen sensitiver für murines IL-7 waren (Abbildung 38 a und e). Weiterhin zeigte sich bei der *CellTrace Violet* Färbung, dass die Konzentrationen 100 ng/ml und 10 ng/ml humanes und azidiertes IL-7 zu einer Proliferation der 2E8-Zellen führten, während 100 ng/ml eine stärkere Wirkung hatte. Bei murinem IL-7 konnte der Unterschied zwischen 100 ng/ml und 10 ng/ml nicht gezeigt werden, da die 2E8 Zellen vermutlich eine Sättigung erreichten und somit führte die Erhöhung der IL-7 Konzentration zu keiner weiteren Steigerung der Proliferationsrate. Geringere Konzentrationen an IL-7 zeigten bei der *CellTrace Violet* Färbung keinen Proliferationsstimulus (Abbildung 38 a, b und d). Als

3. Ergebnisse und Diskussion

Negativkontrolle dienten Zellen ohne IL-7, diese sind in grau dargestellt. Mit diesen beiden Methoden wurde nachgewiesen, dass die Azid-Modifikation einen Einfluss auf die Biofunktionalität des IL-7 hat.

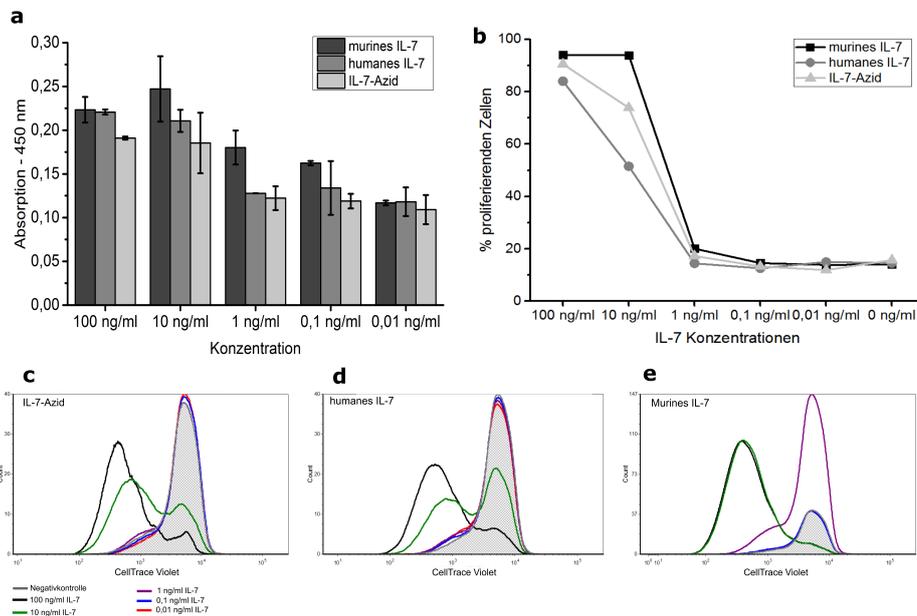


Abbildung 38: Überprüfung der Biofunktionalität nach der Azid-Modifikation von IL-7. a) Mittels BrdU-Proliferationsassay wurde nachgewiesen, dass die Azid-Modifizierung des IL-7 keine Einfluss auf die biologische Funktionalität hat. Durchgeführt wurde der Assay mit IL-7-abhängigen murinen 2E8 Zellen, die nur in Gegenwart von IL-7 proliferieren. Murines und humanes IL-7 dienten als Kontrolle. Es lässt sich keinen relevanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen IL-7 erkennen. b)- e) Der *CellTrace Violet* Farbstoff dient zur Markierung der 2E8 Zellen, damit mehrere Generationen mittels Farbstoffverdünnung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. In b) sind die Prozent an proliferierenden Zellen zusammengefasst aus den Daten von c) - d). Einzeldiagramme sind in c) für IL-7-Azid, d) humanes IL-7 und e) murines IL-7 dargestellt. Zu erkennen ist, dass sowohl 100 ng/ml als auch 10 ng/ml IL-7 bei allen Proben zu einer Proliferation der 2E8 Zellen führt. Somit konnte gezeigt werden, dass die IL-7 Modifizierung keinen Einfluss auf die Biofunktionalität des IL-7 hat.

Expression des IL-7-Rezeptors und Bindungsfähigkeit von IL-7-Azid

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden für den Nachweis angefertigt, dass T-Zellen den IL-7-Rezeptor exprimieren und IL-7-Azid an den Rezeptor binden kann. Beides sind Voraussetzungen für eine erfolgreiche Aufnahme von IL-7 modifizierten Ovalbuminkapseln. Das IL-7-Azid wurde mit einem Tamra-DBCO-Farbstoff gekoppelt, welcher

nur fluoresziert, wenn er erfolgreich an die Azid-Gruppe gebunden war. Somit konnte gewährleistet werden, dass lediglich IL-7-Azid detektiert wurde. Der IL-7-Rezeptor wurde mittels Antikörperfärbung nachgewiesen.

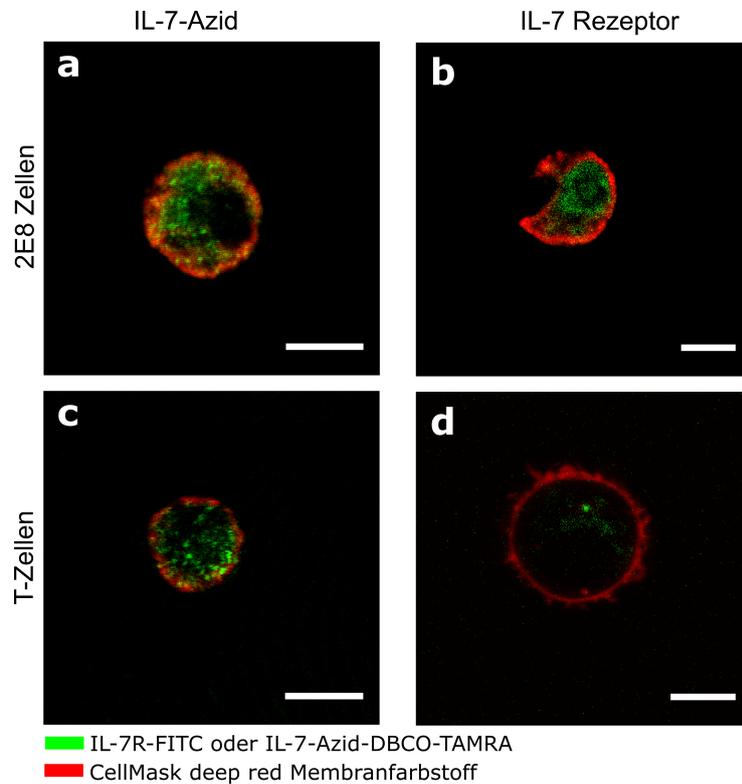


Abbildung 39: Mittels Fluoreszenzaufnahmen wurde nachgewiesen, dass sowohl 2E8-Zellen den IL-7-Rezeptor exprimieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-7-Azid nach Modifizierung noch an den IL-7-Rezeptor binden kann und anschließend internalisiert werden kann. a) 2E8-Zellen mit IL-7-Azid-DBCO-TAMRA b) 2E8-Zellen mit IL-7R-FITC, c) T-Zellen mit IL-7-Azid-DBCO-TAMRA und d) T-Zellen mit IL-7R-FITC. Maßstabsbalken 5 μm .

In Abbildung 39 sind in a) IL-7-Azid bei 2E8-Zellen, b) IL-7-Rezeptor bei 2E8-Zellen, c) IL-7-Azid bei T-Zellen und d) IL-7-Rezeptor bei T-Zellen dargestellt. Zu erkennen ist, dass bei beiden Zellarten IL-7-Azid und IL-7-Rezeptor vorhanden war. Weiterhin ist zu erkennen, dass nach der Bindung von IL-7-Azid und Anti-IL-7-Rezeptor Antikörper es zu einer Internalisierung kam. Eine sehr schnelle Internalisierung des IL-7-Rezeptor durch Bindung von IL-7 wurde schon früher untersucht [174]. Weiterhin

könnte eine schnelle Internalisierung bei der Zellaufnahme von Vorteil sein. Somit hat IL-7 neben dem positiven Einfluss auf die Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen auch den Vorteil einer schnellen Rezeptorinternalisierung nach Bindung [134, 174].

3.4.3. Biofunktionalität des IL-7 nach DBCO-Funktionalisierung

Um zwei Moleküle mittels kupferfreien Klickreaktion miteinander zu verknüpfen, sind zwei funktionelle Gruppen, Azid- und Alkingruppe, nötig. Als Alkin wird meistens DBCO verwendet, welches mittels NHS-Ester an eines der beiden Moleküle angebracht wird. Um vollständige Flexibilität in der Kapselsynthese und der späteren IL-7-Modifizierung zu haben, wurde IL-7 nicht nur mit einem Azid funktionalisiert sondern auch mit einer DBCO-Gruppe.

Wie in Abschnitt 3.4.2 schon beschrieben, kann eine solche Modifizierung die Biofunktionalität des IL-7 beeinflussen. Deshalb war die funktionelle Überprüfung des IL-7-DBCO anhand von 2E8-Zellen mittels BrdU-Assay und *CellTrace Violet* Färbung notwendig. In Abbildung 40 sind die Ergebnisse des BrdU-Assays (a) und der *CellTrace Violet* Färbung (b - e) dargestellt.

Die Ergebnisse des BrdU-Assay zeigten, dass es keinen Unterschied zwischen humanem und DBCO-funktionalisiertem IL-7 gab, lediglich für murines IL-7 waren die 2E8-Zellen sensitiver. Das liegt darin begründet, dass die 2E8-Zellen einen murinen Ursprung haben und deshalb sensitiver sind für murines IL-7. Die Resultate der *CellTrace Violet* Färbung bestätigten die BrdU-Ergebnisse. Hier zeigte sich, dass 100 ng/ml sowohl bei humanen als auch bei DBCO-funktionalisiertem IL-7 zur besten Proliferation führte. Alle anderen Konzentrationen waren vergleichbar mit der Negativkontrolle, die in grau dargestellt ist und nur Zellen ohne IL-7 zeigt. Dass die 2E8-Zellen sensitiver für murines IL-7 waren, zeigte sich auch in Abbildung 40 a und e, so war auch für 1 ng/ml eine gute Proliferation zu sehen.

Die Ergebnisse bestätigten, dass auch die DBCO-Modifizierung keinen Einfluss auf die biologische Funktionalität des IL-7 hatte. Somit können sowohl IL-7-Azid als auch IL-7-DBCO für die kupferfreie Klickreaktion verwendet werden, um Nanokapseln für die Zellaufnahme zu modifizieren.

3.4. Oberflächenmodifizierung von Ovalbumin Kapseln

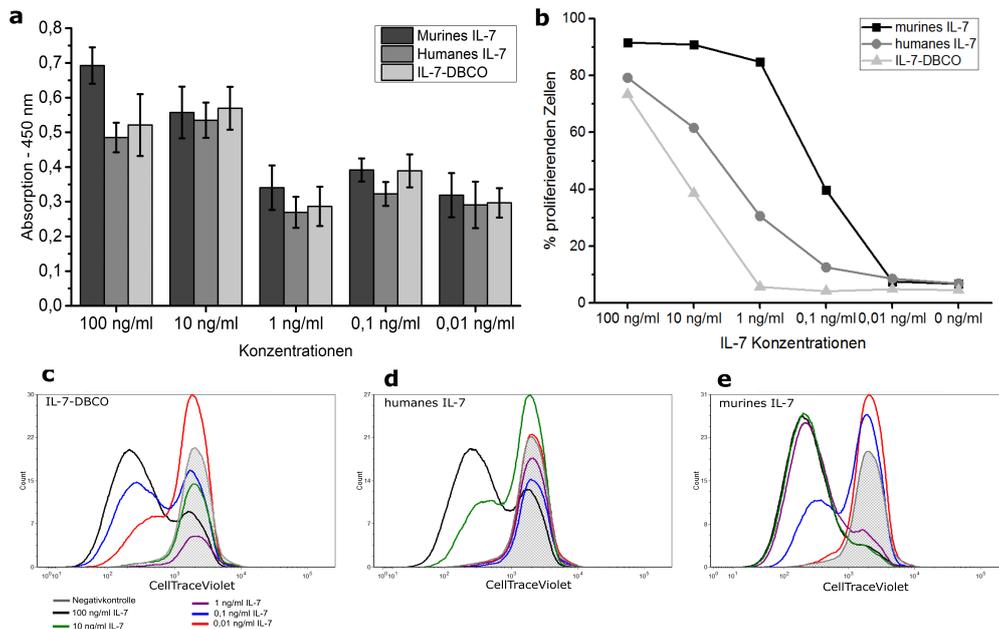


Abbildung 40: Überprüfung der Biofunktionalität nach der DBCO-Modifizierung von IL-7. a) Mittels BrdU-Proliferationsassay wurde nachgewiesen, dass die DBCO-Modifizierung des IL-7 keine Einfluss auf die biologische Funktionalität hat. Durchgeführt wurde der Assay mit IL-7-abhängigen murinen 2E8 Zellen, die nur in Gegenwart von IL-7 proliferieren. Murines und humanes IL-7 dienten als Kontrolle. Es lässt sich keinen relevanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen IL-7 erkennen. b)- e) Der *CellTrace Violet* Farbstoff dient zur Markierung der 2E8 Zellen, damit mehrere Generationen mittels Farbstoffverdünnung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. In b) sind die Prozent an proliferierenden Zellen zusammengefasst aus den Daten von c) - d). Einzeldiagramme sind in c) für IL-7-DBCO, d) humanes IL-7 und e) murines IL-7 dargestellt. Zu erkennen ist, dass sowohl 100 ng/ml als auch 10 ng/ml IL-7 bei allen Proben zu einer Proliferation der 2E8 Zellen führt. Somit konnte gezeigt werden, dass die IL-7 Modifizierung keinen Einfluss auf die Biofunktionalität des IL-7 hat.

3.4.4. Zellaufnahme von modifizierten Ovalbumin Kapseln

Nachdem die Biofunktionalität des modifizierten IL-7 genau untersucht und sichergestellt wurde, dass weder die Azid- noch die DBCO-Modifizierung einen negativen Einfluss hatten, sollte in die Zellaufnahme analysiert werden. Dafür wurden Fluoreszenzaufnahmen von CD8⁺ T-Zellen mit unterschiedliche Ovalbumin-Kapseln angefertigt. Die Inkubation der Ovalbumin-Kapseln mit Zellen betrug 48 Stunden, da aus anderen Ovalbumin-Versuchen schon bekannt war, dass die Aufnahme möglicherweise verzögert ist. Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen mittels *CellMask*

3. Ergebnisse und Diskussion

green/orange Membranfarbstoff gefärbt.

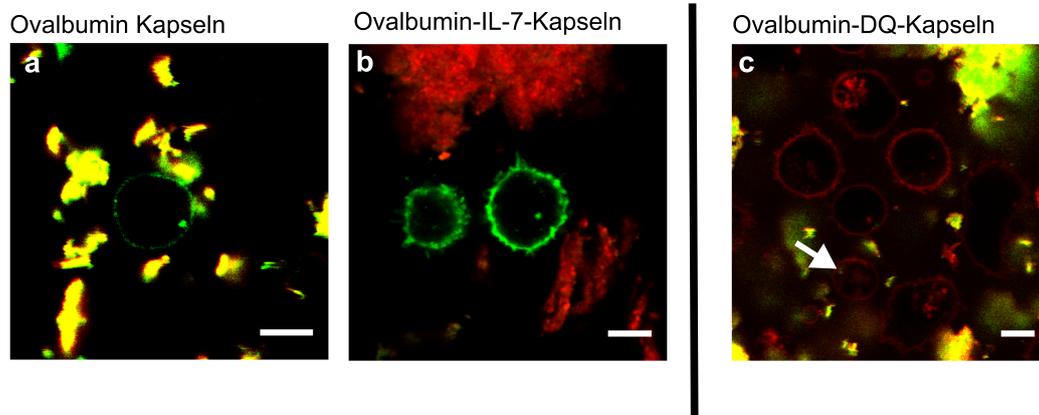


Abbildung 41: Fluoreszenzaufnahmen von Ovalbumin-Kapseln mit unterschiedlichen Modifizierungen und $CD8^+$ T-Zellen. Ovalbumin-Kapseln mit/ohne IL-7 waren mit Cy5-Farbstoff markiert. Ovalbumin-DQ-Kapseln enthielten DQ *green* Substrat. $300 \mu\text{g/ml}$ Kapseln wurden 48 Stunden mit $CD8^+$ T-Zellen inkubiert. Zellen wurden anschließend mit *CellMask green/orange* angefärbt und im cLSM analysiert und bei Bedarf mit Histofix fixiert. a) Ovalbumin-Kapseln ohne IL-7. Kapseln bilden große Aggregate, keine Aufnahme zu erkennen. Der Membranfarbstoff bindet unspezifisch an die Aminogruppe des Ovalbumin. b) Ovalbumin-IL-7-Kapseln. Am oberen Bildrand und rechts unten sind sehr große Aggregate, jedoch ist keine Zellaufnahme zu sehen. c) Ovalbumin-Kapseln mit DQ. Der Pfeil zeigt auf eine aufgenommene und durch Proteasen abgebaute Kapsel. Weiterhin sind große Aggregate der Kapseln zu erkennen. Maßstabsbalken $5 \mu\text{m}$.

In Abbildung 41 sind in a) Ovalbumin-Kapseln, b) Ovalbumin-IL-7-Kapseln und in c) Ovalbumin-DQ-Kapseln mit T-Zellen zu sehen. Sowohl bei Ovalbumin- als auch bei Ovalbumin-IL-7-Kapseln war keine Aufnahme in die $CD8^+$ T-Zellen zu erkennen. Deutlich sichtbar waren große Aggregate der Ovalbumin-Kapseln und eine unspezifische Bindung des *CellMask* Farbstoffes, welche schon bei den Versuchen mit Nanohydrogelen beobachtet wurde. Naheliegend ist auch hier, dass der *CellMask* Farbstoff an Aminogruppen der Ovalbumin-Kapseln bindet.

Der DQ-Bestandteil der Ovalbumin-DQ-Kapseln war ein fluoreszenzmarkiertes Substrat der Proteasen, welches nach enzymatischen Abbau in den Zellen Fluoreszenz frei setzte. So kann der Abbau und die Freisetzung des Kapselinhaltes nachgewiesen werden. Bei dem Experiment mit $CD8^+$ T-Zellen konnte lediglich ein DQ-Signal (Abbildung 41 c), mit Pfeil markiert) in der Zelle detektiert werden. Zu sehen waren wieder große Aggregate der Ovalbumin-Kapseln. Verglichen mit dem Ovalbumin-

DQ-Signal in DCs [33], war das Signal in CD8⁺ T-Zellen vernachlässigbar gering. Es wurde nicht die gleiche Aufnahme rate wie bei dendritische Zellen erwartet, jedoch war die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen auffallend gering und nicht zufriedenstellend. In dieser Arbeit konnte schon gezeigt werden, dass mit kationischen Nanomaterialien eine sehr gute Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen erreicht werden kann (siehe Abschnitte 3.1 und 3.2).

Zellaufnahme von Ovalbumin-Kapseln mit Peptidmodifizierung

Die Oberfläche der Ovalbumin-Kapseln wurden mit einem zellpenetrierenden Peptid PepFect14 (PF14) über kupferfreie Klickreaktion modifiziert. PF14 ist ein sehr gut charakterisiertes und untersuchtes CPP, welches eine nachgewiesene Zellaufnahme aufweist [108, 135]. Die Ovalbumin-Kapseln wurden von Staffan Lindberg mit PF14 modifiziert, um eine höhere Zellaufnahme zu erreichen. In Abbildung 42 sind in a) Ovalbumin-Kapseln und b) Ovalbumin-PF14-Kapseln mit CD8⁺ T-Zellen zu sehen; in c) sind Ovalbumin-Kapseln und d) Ovalbumin-PF14-Kapseln bei der Aufnahme in HEK293T Zellen dargestellt. Bei den T-Zellen ließ sich weder bei den Ovalbumin-Kapseln noch bei den PF-14 modifizierten Ovalbumin-Kapseln eine Aufnahme erkennen. Offensichtlich hatte die PF14 Modifizierung keinen Einfluss auf die Zellaufnahme, da für die direkte Translokation eine Größe kleiner 100 nm entscheidend ist und die Ovalbumin Kapseln mit größer als 150 nm deutlich darüber lagen, besonders weil sehr große Aggregate erkennbar waren.

Im Gegensatz dazu ließ sich bei den HEK293T Zellen eine deutliche Aufnahme bei der Ovalbumin-Kapseln erkennen. Die Aufnahme der Ovalbumin-PF14-Kapseln in HEK293T Zellen war sichtbar höher als bei den unmodifizierten Ovalbumin-Kapseln. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass die Ovalbumin-Kapseln grundsätzlich ein vielversprechendes nanodimensionales Trägersystem sind, jedoch nicht für alle Zellarten. Wie allgemein bekannt zählen T-Zellen zu den sehr schwer transfizierbaren Zellarten [103]. Sie weisen keine ausgeprägten endozytotischen Aufnahmemechanismen auf und besitzen deshalb verglichen mit anderen Zellarten eine sehr geringe Aufnahme rate. Die Ergebnisse zu den Ovalbumin-Kapseln sind ein sehr gutes Beispiel wie wichtig die spezifische Auswahl des nanodimensionalen Trägersystems für jeden individuellen Zelltyp ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

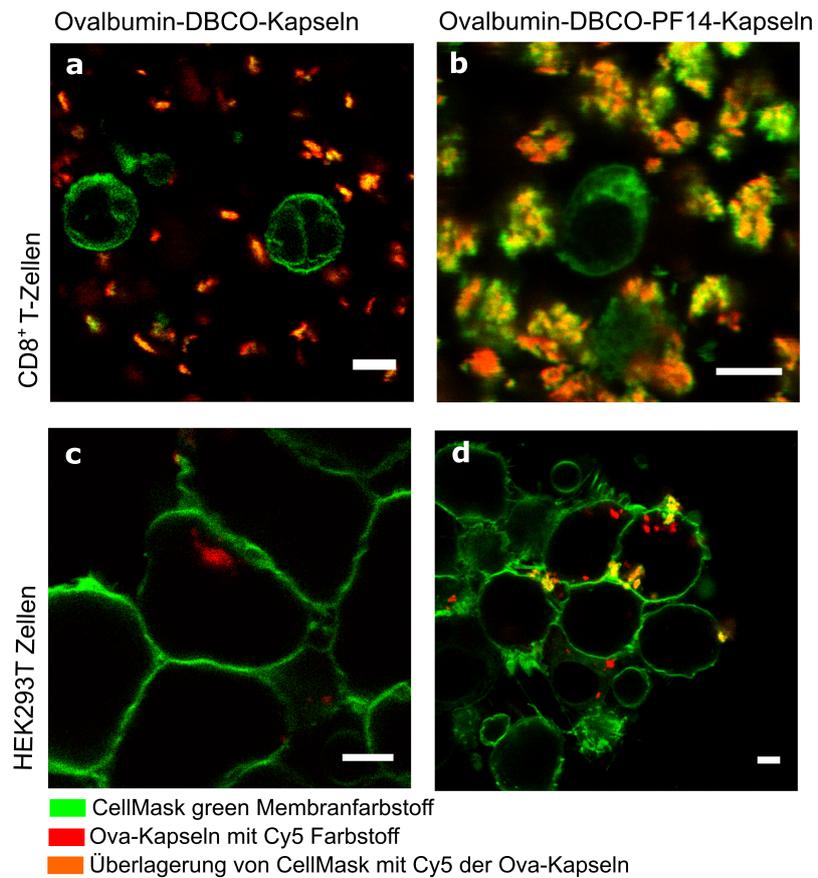


Abbildung 42: Fluoreszenzaufnahmen von Ovalbumin-DBCO-Kapseln mit PF-14 Peptidmodifizierung in CD8⁺ T-Zellen. Ovalbumin-DBCO-Kapseln waren mit Cy5-Farbstoff markiert. 300 $\mu\text{g/ml}$ Kapseln wurden 24 Stunden mit CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Zellen wurden anschließend mit *CellMask green* angefärbt und im cLSM analysiert und bei Bedarf mit Histofix fixiert. a) Ovalbumin-DBCO-Kapseln mit CD8⁺ T-Zellen. Kapseln bilden Aggregate und keine Aufnahme in T-Zellen zu sehen. b) Ovalbumin-DBCO-PF14 Kapseln mit CD8⁺ T-Zellen. Keine Aufnahme in T-Zellen und Aggregatbildung der Kapseln zu erkennen. c) Aufnahme von Ovalbumin-DBCO-Kapseln in HEK293T Zellen zu erkennen. d) Aufnahme von Ovalbumin-DBCO-PF14 in HEK293T Zellen sichtbar. Maßstabsbalken 5 μm .

4. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse zu den Ovalbumin-Kapseln sind ein sehr gutes Beispiel wie wichtig die spezifische Auswahl des nanodimensionalen Trägersystems für jeden individuellen Zelltyp ist. Deshalb sollten die chemischen Eigenschaften nicht nur hinsichtlich des Cargos beachtet werden, sondern auch in Bezug auf die individuellen Eigenschaften der Zellart. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Zellen sehr schwer zu targetieren und transfizieren sind. Nichtsdestotrotz wurden zwei Materialien gefunden, die eine sehr gute Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen zeigten. Es ist nicht vollständig verstanden, warum Blockcopolymere und Nanohydrogele von T-Zellen aufgenommen werden, jedoch modifizierte Ovalbumin-Kapseln nicht. In dieser Arbeit konnten zwei relevante chemische Eigenschaften identifiziert werden, die offensichtlich einen positiven Einfluss auf die T-Zell-Aufnahme haben. So stellten sich eine Größe geringer als 100 nm und eine leicht kationische Gesamtladung als wichtige Faktoren bezüglich der Zellaufnahme in zytotoxische T-Zellen, heraus. Weiterhin scheinen vor allem große (über 200 nm) Nanopartikelsysteme unabhängig der Oberflächenmodifizierung ungünstig für die Aufnahme in CD8⁺ T-Zellen zu sein.

Weiterhin sind die in dieser Arbeit gefunden nanodimensionale Trägersysteme zwei vielversprechende Systeme, um effektiv siRNA in Zellen zu transportieren. Innerhalb dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vorstudien bezüglich Genknockdown durchgeführt. In fortführenden Arbeiten soll intensiveren Fokus auf einen erfolgreichen Knockdown gelegt werden, da die Manipulation von zytotoxischen T-Zellen ein wichtiges und vielversprechendes Werkzeug für eine neue Art der Krebstherapie darstellt. Denn der aktuelle Trend in der Wissenschaft bezüglich der Krebstherapie geht in die Richtung, dass das eigene Immunsystem bzw. Immunzellen so manipuliert werden, dass sie Krebszellen erkennen und effektiv eliminieren können. Und der effektive Knockdown von inhibitorischen Proteinen kann zu einer Erhöhung der T-Zellaktivität führen, die wiederum in einer effizienteren Eliminierung von Krebszellen resultieren kann. Diese Art der Therapie könnte die herkömmlichen Therapieansätze erweitern oder teilweise ablösen.

Literatur

- [1] Mark E Davis, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(9):771–782, 2008.
- [2] BUND. http://www.bund.net/themen_und_projekte/nanotechnologie/, 2016.
- [3] DACHEMA. *10 Jahre Forschung zu Risikobewertung, Human- und Ökotoxikologie von Nanomaterialien*. 2011.
- [4] Andre E Nel, Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M V Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova, and Mike Thompson. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7):543–557, 2009.
- [5] Roberto de la Rica, Daniel Aili, and Molly M. Stevens. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(11):967–978, 2012.
- [6] Jose M Morachis, Enas A Mahmoud, and Adah Almutairi. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. *Pharmacological Reviews*, 64(3):505–519, 2012.
- [7] Samir Mitragotri, Paul A Burke, and Robert Langer. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(9):655–72, 2014.
- [8] M B Yatvin, W Kreutz, B a Horwitz, and M Shinitzky. pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4475):1253–5, dec 1980.
- [9] Yechezkel Barenholz. Doxil?? - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160(2):117–134, 2012.
- [10] Jerome Gilleron, William Querbes, Anja Zeigerer, Anna Borodovsky, Giovanni Marsico, Undine Schubert, Kevin Manygoats, Sarah Seifert, Cordula Andree, Martin Stöter, Hila Epstein-Barash, Ligang Zhang, Victor Koteliansky, Kevin Fitzgerald, Eugenio Fava, Marc Bickle, Yannis Kalaidzidis, Akin Akinc, Martin Maier, and Marino Zerial. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature biotechnology*, 31(7):638–46, jul 2013.

-
- [11] David M. Webster, Padma Sundaram, and Mark E. Byrne. Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1):1–20, 2013.
- [12] Leonard Kaps, Lutz Nuhn, Misbah Aslam, Alexander Brose, Friedrich Foerster, Sebastian Rosigkeit, Patricia Renz, Rosario Heck, Yong Ook Kim, Ingo Lieberwirth, Detlef Schuppan, and Rudolf Zentel. In Vivo Gene-Silencing in Fibrotic Liver by siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles. *Advanced Healthcare Materials*, 4(18):2809–2815, 2015.
- [13] A E Gulyaev, S E Gelperina, I N Skidan, A S Antropov, G Y Kivman, and J Kreuter. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 16(10):1564–9, oct 1999.
- [14] Yuanzeng Min, Joseph M. Caster, Michael J. Eblan, and Andrew Z. Wang. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chemical Reviews*, 115(19):11147–11190, 2015.
- [15] Biao Kang, Patricia Okwieka, Susanne Schöttler, Oliver Seifert, Roland E Kontermann, Klaus Pfizenmaier, Anna Musyanovych, Ralf Meyer, Mustafa Diken, Ugur Sahin, Volker Mailänder, Frederik R Wurm, and Katharina Landfester. Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers. *Biomaterials*, 49:125–34, may 2015.
- [16] Biao Kang, Patricia Okwieka, Susanne Schöttler, Svenja Winzen, Jens Langhanki, Kristin Mohr, Till Opatz, Volker Mailänder, Katharina Landfester, and Frederik R Wurm. Carbohydrate-Based Nanocarriers Exhibiting Specific Cell Targeting with Minimum Influence from the Protein Corona. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 54(25):7436–40, jun 2015.
- [17] Ann-Kathrin Fuchs, Tatiana Syrovets, Karina A Haas, Cornelia Loos, Anna Musyanovych, Volker Mailänder, Katharina Landfester, and Thomas Simmet. Carboxyl- and amino-functionalized polystyrene nanoparticles differentially affect the polarization profile of M1 and M2 macrophage subsets. *Biomaterials*, 85:78–87, apr 2016.
- [18] M. Sapp and M. Bienkowska-Haba. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, 276(24):7206–7216, 2009.
- [19] Zhengwei Mao, Xiangyan Zhou, Changyou Gao, Zhengwei Mao, Xiangyan Zhou, and Changyou Gao. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomaterials Science*, 1(9):896, 2013.

- [20] Agha Zeeshan Mirza and Farhan Ahmed Siddiqui. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *International Nano Letters*, 4(1):94, 2014.
- [21] S.S. Suri, H. Fenniri, and B. Singh. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol.*, 2:16, 2007.
- [22] Agnieszka Wilczewska, Katarzyna Niemirowicz, Karolina Markiewicz, and Halina Car. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5):pp. 1864–1882., 2012.
- [23] Timofei S Zatsepin and Victor Koteliansky. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery – going from bench to bedside. *Int J Nanomedicine.*, 11:3077–3086, 2016.
- [24] Nina Iversen, Baard Birkenes, Kari Torsdalen, and Srdjan Djurovic. Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. *Genetic vaccines and therapy*, 3(2):1–13, 2005.
- [25] Tae Kyung Kim and James H. Eberwine. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8):3173–3178, 2010.
- [26] Taavi Lehto, Kariem Ezzat, Matthew J.A. Wood, and Samir EL Andaloussi. Peptides for nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016.
- [27] Kirk K Hou, Hua Pan, Lee Ratner, Paul H Schlesinger, and Samuel a Wickline. Mechanisms of Nanoparticle-Mediated siRNA Transfection by Melittin-Derived Peptides. *ACS Nano*, 7(10):8605–8615, 2013.
- [28] Hyun Jin Kim, Ahram Kim, Kanjiro Miyata, and Kazunori Kataoka. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104:61–77, 2016.
- [29] Xiuli Hu and Xiabin Jing. Biodegradable amphiphilic polymer-drug conjugate micelles. *Expert opinion on drug delivery*, 6(10):1079–90, 2009.
- [30] Geneviève Gaucher, Marie-Hélène Dufresne, Vinayak P Sant, Ning Kang, Dusica Maysinger, and Jean-Christophe Leroux. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled release*, 109(1-3):169–188, 2005.
- [31] Lutz Nuhn, Markus Hirsch, Bettina Krieg, Kaloian Koynov, Karl Fischer, Manfred Schmidt, Mark Helm, and Rudolf Zentel. Cationic nanohydrogel particles

- as potential siRNA carriers for cellular delivery. *ACS Nano*, 6(3):2198–2214, 2012.
- [32] Ilja Tabujew, Christoph Freidel, Bettina Krieg, Mark Helm, Kaloian Koynov, Klaus Müllen, and Kalina Peneva. The guanidinium group as a key part of water-soluble polymer carriers for siRNA complexation and protection against degradation. *Macromolecular rapid communications*, 35(13):1191–7, jul 2014.
- [33] Ketii Piradashvili, Michael Fichter, Kristin Mohr, Stephan Gehring, Frederik R. Wurm, and Katharina Landfester. Biodegradable Protein Nanocontainers. *Bio-macromolecules*, 16(3):815–821, 2015.
- [34] Rigomar Rieger, Arnd Michaelis, and Melvin M Green. *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*. 1991.
- [35] Gary J Doherty and Harvey T McMahon. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78:857–902, 2009.
- [36] Sean D Conner and Sandra L Schmid. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927):37–44, 2003.
- [37] M Zhu, G Nie, H Meng, and T Xia. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of Chemical Research*, 46(3):622–631, 2012.
- [38] A Aderem and D M Underhill. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*, 17:593–623, 1999.
- [39] A Hall and C D Nobes. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1399):965–70, jul 2000.
- [40] Limei Shen, Tetsuya Higuchi, Ingrid Tubbe, Nicole Voltz, Mathias Krummen, Stefanie Pektor, Evelyn Montermann, Kristin Rausch, Manfred Schmidt, Hansjörg Schild, Stephan Grabbe, and Matthias Bros. A trifunctional dextran-based nanovaccine targets and activates murine dendritic cells, and induces potent cellular and humoral immune responses in vivo. *PloS one*, 8(12):e80904, 2013.
- [41] Prisca Liberali, Elina Kakkonen, Gabriele Turacchio, Carmen Valente, Alexander Spaar, Giuseppe Perinetti, Rainer A Böckmann, Daniela Corda, Antonino Colanzi, Varpu Marjomaki, and Alberto Luini. The closure of Pak1-dependent

- macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *The EMBO journal*, 27(7):970–81, 2008.
- [42] Jet Phey Lim and Paul A Gleeson. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, 89(8):836–843, nov 2011.
- [43] Jason Mercer and Ari Helenius. R E V I E W Virus entry by macropinocytosis. 11(5), 2009.
- [44] Makoto Fujii, Katsuhisa Kawai, Youhei Egami, and Nobukazu Araki. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Scientific reports*, 3:2385, 2013.
- [45] Arwyn Tomos Jones. Macropinocytosis: Searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4):670–684, 2007.
- [46] Satyajit Mayor, Robert G Parton, and Julie G Donaldson. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(6):1–20, 2014.
- [47] Gaurav Sahay, Daria Y. Alakhova, and Alexander V. Kabanov. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3):182–195, 2010.
- [48] Joanna Rejman, Massimo Conese, and Dick Hoekstra. Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes : Role of Clathrin and Caveolae-Mediated. 2104(May):237–247, 2006.
- [49] Yingjuan Lu and Philip S. Low. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 54(5):675–93, sep 2002.
- [50] Jiaqi Lin and Alfredo Alexander-Katz. Cell membranes open "doors"for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. *ACS nano*, 7(12):10799–808, 2013.
- [51] Astrid Gröslund, Fatemeh Madani, Staffan Lindberg, Ülo Langel, and Shiroh Futaki. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of Biophysics*, 2011, 2011.
- [52] Peter Järver and Ülo Langel. Cell-penetrating peptides—A brief introduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(3):260–263, mar 2006.

- [53] S El-Andaloussi, T Holm, and Ulo Langel. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Current pharmaceutical design*, 11(28):3597–611, 2005.
- [54] Chérine Bechara and Sandrine Sagan. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587(12):1693–1702, 2013.
- [55] Margherita Di Pisa, Gérard Chassaing, and Jean Marie Swiecicki. When cationic cell-penetrating peptides meet hydrocarbons to enhance in-cell cargo delivery. *Journal of Peptide Science*, 21(5):356–369, 2015.
- [56] Sara Trabulo, Ana Luísa Cardoso, Miguel Mano, and Maria C Pedroso de Lima. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals*, 3(4):961–993, mar 2010.
- [57] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, and A. Prochiantz. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30):18188–18193, jul 1996.
- [58] Elsa Bárány-Wallje, Jugnu Gaur, Pontus Lundberg, Ulo Langel, and Astrid Gråslund. Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo. *FEBS letters*, 581(13):2389–93, may 2007.
- [59] Sébastien Deshayes, Thomas Plénat, Pierre Charnet, Gilles Divita, Gérard Molle, and Frédéric Heitz. Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(11):1846–51, nov 2006.
- [60] Lindsay E Yandek, Antje Pokorny, Anders Florén, Kristina Knoelke, Ulo Langel, and Paulo F F Almeida. Mechanism of the cell-penetrating peptide transport 10 permeation of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 92(7):2434–2444, 2007.
- [61] Paulo F. Almeida and Antje Pokorny. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: From kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*, 48(34):8083–8093, 2009.
- [62] Lukasz Sadowski, Iwona Pilecka, and Marta Miaczynska. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Experimental cell research*, 315(9):1601–1609, 2009.

- [63] Anne Spang. On the fate of early endosomes. *Biological Chemistry*, 390(8):753–759, 2009.
- [64] Phyllis I. Hanson and Anil Cashikar. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1):337–362, 2012.
- [65] Philip G. Woodman and Clare E. Futter. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4):408–414, 2008.
- [66] J. Paul Luzio, Paul R. Pryor, and Nicholas A. Bright. Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8):622–632, aug 2007.
- [67] Carmine Settembre, Alessandro Fraldi, Diego L Medina, and Andrea Ballabio. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(5):283–96, 2013.
- [68] Lutz Nuhn, Stephanie Tomcin, Kanjiro Miyata, Volker Mailänder, Katharina Landfester, Kazunori Kataoka, and Rudolf Zentel. Size-Dependent Knock-down Potential of siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles. *Biomacromolecules*, 15(11):4111–4121, nov 2014.
- [69] Thomas Braulke and Juan S. Bonifacino. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4):605–614, 2009.
- [70] Robert Schmidt, Thews Gerhard, and Lang Florian. *Physiologie des Menschen*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2000.
- [71] Lonza. <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/hematopoietic-cells/hematopoietic-knowledge-center/pbmcs.aspx>, 2016.
- [72] Sanguine. <http://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>, 2016.
- [73] D English and B R Andersen. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of immunological methods*, 5(3):249–52, aug 1974.
- [74] Ivan J. Fuss, Marjorie E. Kanof, Phillip D. Smith, and Heddy Zola. Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood. In *Current Protocols in Immunology*, number SUPPL. 85, pages 1–8. 2009.

-
- [75] Christopher P Corkum, Danielle P Ings, Christopher Burgess, Sylwia Karwowska, Werner Kroll, and Tomasz I Michalak. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPTTM) and standard density gradient. *BMC immunology*, 16(1):48, 2015.
- [76] CellApplication. <https://www.cellapplications.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cells-hpbmc>, 2016.
- [77] Yann Parel and Carlo Chizzolini. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity reviews*, 3(3):215–20, mar 2004.
- [78] M H Andersen, D Schrama, P Thor Straten, and J C Becker. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 126(1):32–41, 2006.
- [79] Rolf M Zinkernagel. Cellular Immune Recognition And The Biological Role Of Major Transplantation Antigens, 1996.
- [80] D N Garboczi, P Ghosh, U Utz, Q R Fan, W E Biddison, and D C Wiley. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 384(6605):134–41, nov 1996.
- [81] Nele M G Dieckmann, Gordon L Frazer, Yukako Asano, Jane C Stinchcombe, and Gillian M Griffiths. The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. pages 2881–2886, 2016.
- [82] Xiaopei Huang and Yiping Yang. Targeting costimulatory pathways in gene therapy. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP):1–7, 2011.
- [83] Rebecca J. Greenwald, Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology*, 23(1):515–548, apr 2005.
- [84] Jerome Thiery, Dennis Keefe, Saviz Saffarian, Denis Martinvalet, Michael Walch, Emmanuel Boucrot, Tomas Kirchhausen, and Judy Lieberman. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood*, 115(8):1582–1593, 2010.
- [85] Jerome Thiery, Dennis Keefe, Steeve Boulant, Emmanuel Boucrot, Michael Walch, Denis Martinvalet, Ing Swie Goping, R Chris Bleackley, Tomas Kirchhausen, and Judy Lieberman. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immunology*, 12(8):770–777, 2011.

- [86] Joseph A. Trapani and Mark J. Smyth. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*, 2(10):735–47, oct 2002.
- [87] C Castelli, L Rivoltini, G Andreola, M Carrabba, N Renkvist, and G Parmiani. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *Journal of cellular physiology*, 182(3):323–31, mar 2000.
- [88] A. Karolina Palucka and Lisa M. Coussens. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*, 164(6):1233–1247, 2016.
- [89] Sander Kelderman and Pia Kvistborg. Tumor antigens in human cancer control. *Biochimica et biophysica acta*, 1865(1):83–89, 2015.
- [90] Ayumu Ito, Shunsuke Kondo, Kohei Tada, and Shigehisa Kitano. Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *BioMed research international*, 2015:605478, 2015.
- [91] a J Zajac, J N Blattman, K Murali-Krishna, D J Sourdive, M Suresh, J D Altman, and R Ahmed. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine*, 188(12):2205–2213, 1998.
- [92] A Gallimore, A Glithero, A Godkin, A C Tissot, A Plückthun, T Elliott, H Hengartner, and R Zinkernagel. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine*, 187(9):1383–93, 1998.
- [93] E John Wherry. T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 13(6):492–499, jun 2011.
- [94] E. John Wherry and Makoto Kurachi. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8):486–499, 2015.
- [95] David Masopust and Jason M Schenkel. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature reviews. Immunology*, 13(5):309–20, may 2013.
- [96] Andrea Schietinger and Philip D Greenberg. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in immunology*, pages 1–10, nov 2013.

- [97] Michael Quigley, Florencia Pereyra, Björn Nilsson, Filippos Porichis, Catia Fonseca, Quentin Eichbaum, Boris Julg, Jonathan L Jesneck, Kathleen Brosnahan, Sabrina Imam, Kate Russell, Ildiko Toth, Alicja Piechocka-Trocha, Douglas Dolfi, Jill Angelosanto, Alison Crawford, Haina Shin, Douglas S Kwon, Jennifer Zupkosky, Loise Francisco, Gordon J Freeman, E John Wherry, Daniel E Kaufmann, Bruce D Walker, Benjamin Ebert, and W Nicholas Haining. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nature medicine*, 16(10):1147–51, oct 2010.
- [98] E John Wherry, Joseph N Blattman, Kaja Murali-Krishna, Robbert van der Most, and Rafi Ahmed. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of virology*, 77(8):4911–27, apr 2003.
- [99] Shawn D Blackburn, Haina Shin, W Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J Workman, Antonio Polley, Michael R Betts, Gordon J Freeman, Dario A A Vignali, and E John Wherry. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology*, 10(1):29–37, jan 2009.
- [100] David G. Brooks, Dorian B. McGavern, and Michael B A Oldstone. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *The Journal of clinical investigation*, 116(6):1675–85, jun 2006.
- [101] Arlene H Sharpe, E John Wherry, Rafi Ahmed, and Gordon J Freeman. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*, 8(3):239–45, mar 2007.
- [102] Jedd D Wolchok, Harriet Kluger, Margaret K Callahan, Michael a Postow, Naiyer a Rizvi, Alexander M Lesokhin, Neil H Segal, Charlotte E Ariyan, Ruth-Ann Gordon, Kathleen Reed, Matthew M Burke, Anne Caldwell, Stephanie a Kronenberg, Blessing U Agunwamba, Xiaoling Zhang, Israel Lowy, Hector David Inzunza, William Feely, Christine E Horak, Quan Hong, Alan J Korman, Jon M Wigginton, Ashok Gupta, and Mario Sznol. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine*, 369(2):122–33, jul 2013.
- [103] Michael Freeley and Aideen Long. Advances in siRNA delivery to T-cells: potential clinical applications for inflammatory disease, cancer and infection. *The Biochemical journal*, 455(2):133–47, oct 2013.

- [104] R. Q. Cron, L. A. Schubert, D. B. Lewis, and C. C W Hughes. Consistent transient transfection of DNA into non-transformed human and murine T-lymphocytes. *Journal of Immunological Methods*, 205(2):145–150, 1997.
- [105] Wendy Lai, Cheong Hee Chang, and Donna L. Farber. Gene transfection and expression in resting and activated murine CD4 T cell subsets. *Journal of Immunological Methods*, 282(1-2):93–102, 2003.
- [106] Akiko Eguchi, Bryan R Meade, Yung-Chi Chang, Craig T Fredrickson, Karl Willert, Nitin Puri, and Steven F Dowdy. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nature biotechnology*, 27(6):567–571, 2009.
- [107] Philipp Oberdoerffer, Chryssa Kanellopoulou, Corinna Paeper, Christine Borowski, Anjana Rao, Klaus Rajewsky, Vigo Heissmeyer, and Iannis Aifantis. Efficiency of RNA Interference in the Mouse Hematopoietic System Varies between Cell Types and Developmental Stages Efficiency of RNA Interference in the Mouse Hematopoietic System Varies between Cell Types and Developmental Stages. *Mol. Cell. Biol.*, 25(10):3896–3905, 2005.
- [108] Kadi-liis Veiman, Imre Ma, Kariem Ezzat, Helerin Margus, To Lehto, Kent Langel, Kaido Kurriko, Piret Arukuusk, and Julia Suhoruts. PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. 2013.
- [109] Dan Peer and Motomu Shimaoka. Systemic siRNA delivery to leukocyte-implicated diseases ND ES OS CE NO ST ND ES OS ST. *Cell cycle Georgetown Tex*, 8(March):853–859, 2009.
- [110] Caroline Cole, Jian Qiao, Timothy Kottke, Rosa Maria Diaz, Atique Ahmed, Luis Sanchez-Perez, Gregory Brunn, Jill Thompson, John Chester, and Richard G Vile. Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nat Med*, 11(10):1073–1081, 2005.
- [111] Laura Wayteck, Heleen Dewitte, Lynn De Backer, Karine Breckpot, Jo De-meester, Stefaan C. De Smedt, and Koen Raemdonck. Hitchhiking nanoparticles: Reversible coupling of lipid-based nanoparticles to cytotoxic T lymphocytes. *Biomaterials*, 77:243–254, 2016.
- [112] Lei Sun, Jingjing Wu, and Shounan Yi. Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transplant Immunology*, 26(2-3):71–80, 2012.

- [113] Farah Ketroussi, Massimo Giuliani, Rajia Bahri, Bruno Azzarone, Bernard Charpentier, and Antoine Durrbach. Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway. *PLoS ONE*, 6(8):1–8, 2011.
- [114] Oren Milstein, David Hagin, Assaf Lask, Shlomit Reich-zeliger, Elias Shezen, Eran Ophir, Yaki Eidelstein, Ran Afik, Yaron E Antebi, Michael L Dustin, and Yair Reisner. T-cell recognition. *Blood*, 117(3):1042–1052, 2011.
- [115] Sabine Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- [116] DSMZ. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-282.html>, 2016.
- [117] K Ishihara, K Medina, S Hayashi, C Pietrangeli, A E Namen, K Miyake, and P W Kincade. Stromal-cell and cytokine-dependent lymphocyte clones which span the pre-B- to B-cell transition. *Dev Immunol*, 1(C):149–161, 1991.
- [118] ATCC. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-239.aspx?geo_country=de#culturemethod, 2016.
- [119] P A Wender, D J Mitchell, K Pattabiraman, E T Pelkey, L Steinman, and J B Rothbard. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24):13003–8, 2000.
- [120] Beibei Wang, Yanfang Wang, Hao Wu, Xiaojie Song, Xin Guo, Demeng Zhang, Xiaojun Ma, and Mingqian Tan. A mitochondria-targeted fluorescent probe based on TPP-conjugated carbon dots for both one- and two-photon fluorescence cell imaging. *RSC Advances*, 4:49960–49963, 2014.
- [121] Ruth Duncan. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature reviews. Cancer*, 6(9):688–701, 2006.
- [122] Allan S Hoffman. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1):3–12, 2002.
- [123] Jung Kwon Oh, Ray Drumright, Daniel J. Siegwart, and Krzysztof Matyjaszewski. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(4):448–477, 2008.
- [124] Lutz Nuhn, Lydia Braun, Iris Overhoff, Annette Kelsch, David Schaeffel, Kaloi-an Koynov, and Rudolf Zentel. Degradable cationic nanohydrogel particles for

- stimuli-responsive release of siRNA. *Macromolecular Rapid Communications*, 35(24):2057–2064, 2014.
- [125] K. Landfester. The generation of nanoparticles in miniemulsions. *Advanced Materials*, 13(10):765–768, 2001.
- [126] Katharina Landfester, Mirjam Willert, and Markus Antonietti. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules*, 33(7):2370–2376, 2000.
- [127] P. John Blythe, E. David Sudol, and Mohammed S. El-Aasser. Recent advances in miniemulsion polymerization. *Macromolecular Symposia*, 150(1):179–186, feb 2000.
- [128] Katharina Landfester and Volker Mailänder. Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization. *Expert opinion on drug delivery*, 10(5):593–609, may 2013.
- [129] Katharina Landfester and Clemens K. Weiss. Encapsulation by Miniemulsion Polymerization. In *Advances in Polymer Science*, number May 2012, pages 1–49. 2010.
- [130] Volker Mailänder and Katharina Landfester. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10(9):2379–400, sep 2009.
- [131] Ahmed O. Elzoghby, Wael M. Samy, and Nazik A. Elgindy. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2):168–182, 2012.
- [132] Michael J. Hawkins, Patrick Soon-Shiong, and Neil Desai. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8):876–885, 2008.
- [133] William J Gradishar. Albumin-bound paclitaxel : a next-generation taxane. 6566(14), 2006.
- [134] Serena K Perna, Daria Pagliara, Aruna Mahendravada, Hao Liu, Malcolm K Brenner, Barbara Savoldo, and Gianpietro Dotti. Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirectioned cytotoxic T lymphocytes without enhancement of regulatory T-cell inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2013.
- [135] Kariem Ezzat, Samir E L Andaloussi, Eman M. Zaghoul, Taavi Lehto, Staffan Lindberg, Pedro M D Moreno, Joana R. Viola, Tarek Magdy, Rania Abdo,

- Peter Guterstam, Rannar Sillard, Suzan M. Hammond, Matthew J A Wood, Andrey A. Arzumanov, Michael J. Gait, C. I Edvard Smith, Mattias Hällbrink, and Ülo Langel. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic acids research*, 39(12):5284–98, jul 2011.
- [136] Sebastien Perrier and Pittaya Takolpuckdee. Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(22):5347–5393, nov 2005.
- [137] Grit Baier, Anna Musyanovych, Martin Dass, Sonja Theisinger, and Katharina Landfester. Cross-linked starch capsules containing dsDNA prepared in inverse miniemulsion as "nanoreactors" for polymerase chain reaction. *Biomacromolecules*, 11(4):960–968, 2010.
- [138] Michael V. Berridge, Patries M. Herst, and An S. Tan. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.):127–152, 2005.
- [139] Sarah E. Exley, Lea C. Paslay, Gyan S. Sahukhal, Brooks A. Abel, Tyler D. Brown, Charles L. McCormick, Sabine Heinhorst, Veena Koul, Veena Choudhary, Mohamed O. Elasri, and Sarah E. Morgan. Antimicrobial Peptide Mimicking Primary Amine and Guanidine Containing Methacrylamide Copolymers Prepared by Raft Polymerization. *Biomacromolecules*, 16(12):3845–3852, 2015.
- [140] Annette Kelsch, Stephanie Tomcin, Kristin Rausch, Matthias Barz, Volker Mailänder, Manfred Schmidt, Katharina Landfester, and Rudolf Zentel. HPMA copolymers as surfactants in the preparation of biocompatible nanoparticles for biomedical application. *Biomacromolecules*, 13(12):4179–4187, 2012.
- [141] Ying Jiang, Rui Tang, Bradley Duncan, Ziwen Jiang, Bo Yan, Rubul Mout, and Vincent M. Rotello. Direct cytosolic delivery of siRNA using nanoparticle-stabilized nanocapsules. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(2):506–510, 2015.
- [142] Yong Dai, Bao Kuo Lv, Xin Fu Zhang, and Yi Xiao. A two-photon mitotracker based on a naphthalimide fluorophore: Synthesis, photophysical properties and cell imaging. *Chinese Chemical Letters*, 25(7):1001–1005, 2014.
- [143] S Schöttler, Katja Klein, K Landfester, and V Mailänder. Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake. *Nanoscale*, 00:1–3, 2015.

- [144] Hironori Iida, Kosuke Takayanagi, Takuya Nakanishi, Akiko Kume, Kouji Muramatsu, Yoshio Kiyohara, Yasuto Akiyama, and Tetsuya Osaka. Preparation of human immune effector T cells containing iron-oxide nanoparticles. *Bio-technology and Bioengineering*, 101(6):1123–1128, 2008.
- [145] Camilla Foged, Birger Brodin, Sven Frokjaer, and Anne Sundblad. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(2):315–322, 2005.
- [146] Giulio Caracciolo, Sara Palchetti, Valentina Colapicchioni, Luca Digiacomo, Daniela Pozzi, Anna Laura Capriotti, Giorgia La Barbera, and Aldo Laganà. Stealth effect of biomolecular corona on nanoparticle uptake by immune cells. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 31(39):10764–73, oct 2015.
- [147] Ryan M Pearson, Vanessa V Juettner, and Seungpyo Hong. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Frontiers in chemistry*, 2(November):108, 2014.
- [148] John R. Gordon, Yanna Ma, Laura Churchman, Sara A. Gordon, and Wojciech Dawicki. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(JAN):1–19, 2014.
- [149] Jacques Mbongue, Dequina Nicholas, Anthony Firek, and William Langridge. The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014.
- [150] Ute Steinfeld, Christine Pauli, Nikolas Kaltz, Christian Bergemann, and Hyeck-Hee Lee. T lymphocytes as potential therapeutic drug carrier for cancer treatment. *International journal of pharmaceutics*, 311(1-2):229–36, mar 2006.
- [151] Anne Heller, Gero Brockhoff, and Achim Goepferich. Targeting drugs to mitochondria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1):1–18, 2012.
- [152] Vladimir P. Torchilin. Recent Approaches To Intracellular Delivery of Drugs and Dna and Organelle Targeting. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1):343–375, 2006.
- [153] Jack T H Wang, Rohan D. Teasdale, and David Liebl. Macropinosome quantitation assay. *MethodsX*, 1(1):36–41, 2014.

- [154] A Nicole Desch, Sophie L. Gibbings, Eric T. Clambey, William J. Janssen, Jill E. Slansky, Ross M. Kedl, Peter M. Henson, and Claudia Jakubzick. Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nature Communications*, 5(3):4674, aug 2014.
- [155] Ronny Uzana, Galit Eisenberg, Sharon Merims, Shoshana Frankenburg, Aviad Pato, Eitan Yefenof, Roni Engelstein, Tamar Peretz, Arthur Machlenkin, and Michal Lotem. Human T cell crosstalk is induced by tumor membrane transfer. *PLoS ONE*, 10(2):1–15, 2015.
- [156] P Brossart and M J Bevan. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood*, 90(4):1594–1599, 1997.
- [157] Sara Sigismund, Elisabetta Argenzio, Daniela Tosoni, Elena Cavallaro, Simona Polo, and Pier Paolo Di Fiore. Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Developmental Cell*, 15(2):209–219, 2008.
- [158] Andre E Nel, Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M V Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova, and Mike Thompson. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7):543–57, jul 2009.
- [159] Ayman El-Sayed and Hideyoshi Harashima. Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. *Molecular Therapy*, 21(6):1118–1130, apr 2013.
- [160] Marko Jovic, Mahak Sharma, Juliati Rahajeng, and Steve Caplan. The early endosome: A busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and Histopathology*, 25(1):99–112, 2010.
- [161] Vicente a Torres and Dwayne G Stupack. Rab5 in the regulation of cell motility and invasion. *Current protein & peptide science*, 12(1):43–51, 2011.
- [162] J M Wilson, M de Hoop, N Zorzi, B H Toh, C G Dotti, and R G Parton. EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 11(8):2657–71, 2000.
- [163] A. Komin, L M Russell, K A Hristova, and P C Searson. Peptide-based strategies for enhanced cell uptake, transcellular transport, and circulation: Mechanisms and challenges. *Advanced drug delivery reviews*, pages 1–13, jun 2016.

- [164] Sébastien Deshayes, Sabine Gerbal-Chaloin, May C. Morris, Gudrun Aldrian-Herrada, Pierre Charnet, Gilles Divita, and Frédéric Heitz. On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochimica et biophysica acta*, 1667(2):141–7, dec 2004.
- [165] J Tilstra, K K Rehman, T Hennon, S E Plevy, P Clemens, and P D Robbins. Protein transduction: identification, characterization and optimization. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 4):811–5, aug 2007.
- [166] Bernd A. Schröder, Christian Wrocklage, Andrej Hasilik, and Paul Saftig. The proteome of lysosomes. *PROTEOMICS*, 10(22):4053–4076, nov 2010.
- [167] Samir E L Andaloussi, Taavi Lehto, Imre Mäger, Katri Rosenthal-Aizman, Iulian I. Oprea, Oscar E. Simonson, Helena Sork, Kariem Ezzat, Dana M. Copolovici, Kaido Kurrikoff, Joana R. Viola, Eman M. Zaghloul, Rannar Sillard, Henrik J. Johansson, Fatouma Said Hassane, Peter Guterstam, Julia Suhorutšenko, Pedro M D Moreno, Nikita Oskolkov, Jonas Hålldin, Ulf Tedebark, Andres Metspalu, Bernard Lebleu, Janne Lehtiö, C. I Edvard Smith, and Ulo Langel. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic acids research*, 39(9):3972–87, may 2011.
- [168] Viktoriya Sokolova, Diana Kozlova, Torben Knuschke, Jan Buer, Astrid M. Westendorf, and Matthias Epple. Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta Biomaterialia*, 9(7):7527–7535, 2013.
- [169] Lutz Nuhn, Sabine Gietzen, Kristin Mohr, Karl Fischer, Kazuko Toh, Kanjiro Miyata, Yu Matsumoto, Kazunori Kataoka, Manfred Schmidt, and Rudolf Zentel. Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules*, 15(4):1526–1533, 2014.
- [170] Susanne Schöttler, Katharina Landfester, and Volker Mailänder. Controlling the Stealth Effect of Nanocarriers through Understanding the Protein Corona. *Angewandte Chemie International Edition*, pages 2–12, 2016.
- [171] Stefan Tenzer, Dominic Docter, Susanne Rosfa, Alexandra Wlodarski, Jörg Kuharev, Alexander Reikik, Shirley K. Knauer, Christoph Bantz, Thomas Nawroth, Carolin Bier, Jarinratn Sirirattanapan, Wolf Mann, Lennart Treuel, Reinhard Zellner, Michael Maskos, Hansjörg Schild, and Roland H. Stauber. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano*, 5(9):7155–67, sep 2011.

- [172] Heidrun Wartlick, Birgit Spänkuch-Schmitt, Klaus Strebhardt, Jörg Kreuter, and Klaus Langer. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 96(3):483–495, 2004.
- [173] Salka Keller, John T. Wilson, Gabriela I. Patilea, Hanna B. Kern, Anthony J. Convertine, and Patrick S. Stayton. Neutral polymer micelle carriers with pH-responsive, endosome-releasing activity modulate antigen trafficking to enhance CD8⁺ T cell responses. *Journal of Controlled Release*, 191:24–33, 2014.
- [174] Catarina M Henriques, José Rino, Robert J Nibbs, Gerry J Graham, and João T. Barata. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood*, 115(16):3269–3277, 2010.

Appendices

Anhang A Verwendete Materialien

A.1 Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Absaughilfe Vacusafe comfort	IBD Integra Bioscience, DE
Analysewaage XC205 Dual Range	Mettler-Toledo, CH
Automatische Zellzähler	Bio-Rad, USA
Durchflusszytometer BD LSRFortessa	BD Biosciences, USA
Durchflusszytometer CyFlow ML	Partec, Sysmex, JPN
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, DE
Gefrierschrank -80°C, Hera Freeze Top	Thermo Fisher Scientific, USA
Inkubator C200	Labotec, DE
Inverses Lichtmikroskop CKX41	Olympus, DE
Konfokales Laserrastermikroskop, cLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica, DE
MACS Halterung QuadroMACS	Miltenyi Biotec, DE
Mr. Frosty Freezing container	Thermo Fisher Scientific, USA
Neubauer Zählkammer	Hirschmann EM Techcolor, DE
Pipetten	Eppendorf, DE
Pipettierhilfe Accujet Pro	Brand, DE
Plate Reader Infinite M1000	Tecan, CH
Sterilbank, Cell culture flow c(MAX-Pro) ³ -130	Berner, DE
Stickstofftank LS6000	Taylor-Wharton, DE
Tischzentrifuge 5430	Eppendorf, DE
Vortex Mixer Reax Control	Heidolph, DE
Wasserbad	Memmert, DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, DE

A.2 Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
8-well ibidi Slide	ibidi, DE
Durchflusszytometer Röhrrchen	BD Biosciences, USA
Durchflusszytometer Röhrrchen	Sarstedt, DE
Eppendorf Röhrrchen 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, DE
Kyroröhrrchen	Greiner Bio-one, DE
MACS Säulen Column LS	Miltenyi Biotec, DE
Objektträger autom. Zellzähler	Bio-Rad, USA
Pasteurpipetten	Brand, DE
Pipettenspitzen (2,5 μ l)	Biozym Scientific, DE
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one, DE
Skalpell	B.Braun, DE
Sterile Pipettenspitzen	Starlab, UK
Well-Platten	Greiner Bio-one, DE
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, DE
Zellsiebe 100 μ m	Greiner Bio-one, DE
Zentrifugenröhrrchen, Falcon [®]	Greiner Bio-one, DE

A.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Die Chemikalien, Puffer und Lösungen, die Anwendung in dieser Arbeit gefunden haben sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
7-AAD	Sigma Aldrich, USA
AlexaFluor [®] 647 Cadaverine	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
BrdU Cell Proliferation Assay Kit	Cell Signaling Technologies, USA
Beta-Mercaptoethanol	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Hersteller
BSA	Sigma Aldrich, USA
CellMask Plasma Membrane Stain	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, USA
CellTrace Violet	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
DBCO-PEG4-5/6-TAMRA Farbstoff	Jena Bioscience, DE
DMSO	Sigma Aldrich, USA
EDTA	Sigma Aldrich, USA
Essigsäure	Sigma Aldrich, USA
FBS	Thermo Fisher Scientific, USA
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	Biologend, USA
GMCSF	Bayer, DE
Histofix 4 % PFA	Carl Roth, DE
Histopaque [®]	Sigma Aldrich, USA
humanes IL-4	Promokine, DE
humanes IL-7	Prospecbio, ISR
IMDM Medium	ATCC, USA
Kalibrierungsbeads	BD Biosciences, USA
Kalibrierungsbeads	Partec, Sysmex, JPN
MACS, CD8 Beads	Miltenyi Biotec, DE
murines IL-7	Prospecbio, ISR
Pacific Blue Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biologend
PBS	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
Proleukin [®] s (IL-2)	Novartis, CHE
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, USA
RPMI-1640 Medium	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich, USA
WGA AlexaFluor488	Thermo Fisher Scientific, USA
Zombie Aqua [™] Fixable Viability Kit	Biologend, USA

A.4 Primäre Zellen und Zelllinien

In der nachfolgenden Tabelle sind die primäre Zellen und Zelllinien aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 10: Verwendete primäre Zellen und Zelllinien.

Bezeichnung	Zelltyp	Lieferant
2E8	Murine B-Lymphozyten aus Knochenmark	ATCC, USA
Jurkat	Immortalisierte CD3 ⁺ T-Lymphozyten	DSMZ, DE
T-Zellen	Periphere mononukleäre Blutzellen, isoliert aus Buffy Coats	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz, DE
iDCs	Periphere mononukleäre Blutzellen, isoliert aus Buffy Coats	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz, DE

A.5 siRNA

In der nachfolgenden Tabelle sind die siRNAs mit Sequenzen oder Referenznummern aufgelistet.

Tabelle 11: Verwendete siRNA.

Zielgen	Sequenz/Ref. Nummer	Lieferant
TNF	5'-GAGUAACCAGCUGGUGGCCA-3'-Atto488, Überhang dTdT am 3'	IBA, DE
CD85j	SI04166918, SI00090951	Qiagen, DE

A.6 Antikörper

Die nachfolgende Tabelle beinhaltet alle Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Anti-human CD3, Klone OKT3	Stimulierung	AG Wölfel, Unimedizin Mainz
Anti-human CD3, Klone OKT2	Stimulierung	eBioscience, USA
Anti-human CD4, APC	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD4, PacificBlue	FCM	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human CD4, PerCP	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD8, APC	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD8, APC-AlexaFluor750	FCM	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human CD8, FITC	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD8, PacificBlue	FCM	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human CD8, PerCP	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD25, PE	FCM	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human CD69, TexasRed	FCM	BD Horizon, USA
Anti-human CD85j, APC	FCM	Biologend, USA
Anti-human CD137, APC	FCM	Life Technologies Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human CTLA-4 (CD152), APC	FCM	Life Technologies Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-human IL-7R (CD127), FITC	FCM	Biologend (USA)
Anti-human PD-1 (CD279), FITC	FCM	Biologend (USA)
Anti-human Rab5	Immunfärbung	Life Technologies
Anti-mouse IL-7R (CD127), FITC	FCM	Biologend (USA)
Anti-mouse AlexaFluor488	Sek. AK	Life Technologies
MACS Anti-human CD8 MicroBeads	Aufreinigung	Miltenyi Biotec (D)

A.7 Software und Programme

In dieser Arbeit fanden folgende Programme Anwendung.

Tabelle 13: Verwendete Software und Programme.

Software	Hersteller/Quelle
ChemBioDraw Ultra 14.0	Cambridgesoft, UK
FACSDiva Software	BD Biosciences, USA
FCS Express 4	DeNovo Software, USA
FlowMax 3	Sysmex, Partec, JPN
Gimp 2.8	www.gimp.org
i-control 1.6.21	Tecan, DE
ImageJ (Fiji)	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Inkscape	https://inkscape.org/de/
LAS AF confocal software	Leica, DE
Mendeley	https://www.mendeley.com/
MiKTeX 2.9	http://miktex.org/
MS Office	Microsoft, USA
Origin 9.1	OriginLab, USA
TexStudio (LaTeX)	http://texstudio.sourceforge.net