



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

***Synthese und Charakterisierung von  
Polymer-Wirkstoff-Antikörper Konjugaten  
zur Anwendung in der  
Krebsimmuntherapie***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von Sabine Gietzen  
geboren in Wittlich

Mainz, März 2015





**Dekan:**

████████████████████

**1. Berichterstatter:**

██

**2. Berichterstatter:**

████████████████████████████████

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015**



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2012 bis März 2015 am Institut für Physikalische Chemie unter Betreuung von [REDACTED] angefertigt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 02.03.2015



## *Meinen Eltern*

*„Mache die Dinge so einfach wie möglich – aber nicht einfacher.“*

(Albert Einstein)





## Zusammenfassung

Polymere Wirkstoffsysteme gewinnen im Bereich der biomedizinischen Forschung immer größeres Interesse. Vielversprechende Systeme für die Entwicklung von neuartigen Krebsimmuntherapien stellen insbesondere Polymer-Konjugate dar. Das ideale Polymer-Konjugat besitzt eine Größe zwischen 10 nm und 100 nm, ist nicht zytotoxisch und zeigt keine Aggregation in humanem Blutserum.<sup>[148]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese und Charakterisierung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie behandelt.

Erstes Ziel der Arbeit war es, geeignete polymere Trägersysteme für die *in vivo* Anwendung zu finden. Hierzu wurde zunächst die Stabilität verschiedener potentieller polymerer Trägersysteme (Nanohydrogele, Succinyliertes-Poly-L-Lysin (Bürste), ELP-Bürsten und Poly(2-oxazolin)bürsten) in humanem Serum untersucht.

Weiterhin wurde die unspezifische Zellaufnahme in murinen dendritischen Zellen (DCs) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem neutrale bzw. zwitterionische Partikel eine hohe Serumstabilität sowie keine unspezifische Zellaufnahme zeigen.

Um eine gezielte Adressierung der DCs des Immunsystems zu erreichen und dadurch eine Immunantwort gegenüber einem bestimmten Krebs Zelltyp zu induzieren, wurden Biokonjugate - auf Basis der Succinylierten-Poly-L-Lysin-(Bürste) sowie der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürste (POx) – entwickelt, da diese Polymerbürsten keine bzw. kaum unspezifische Aufnahme in DCs zeigen. Hierbei diente der Antikörper aDEC205 der gezielten Adressierung von CD8+ DCs. Die weiteren bioaktiven Komponenten waren das tumorassoziierte Antigen (TAA) mit der Kernsequenz SIINFEKL zur Induktion einer spezifischen Immunantwort sowie der immunaktivierende TLR9 Ligand, CpG1826.

Die Komponenten wurden nacheinander an die Fluoreszenz-markierten Polymere konjugiert. Die Konjugation des Antikörpers erfolgte nach vorangegangener DIBO-Modifizierung über kupferfreie Click-Chemie. Mit einer optimierten Aufarbeitungsmethodik gelang es, aggregatfreie, unimere DIBO-modifizierte aDEC205 Antikörper zu isolieren. Für die succinylierten Poly-L-Lysine konnten keine eindeutigen sowie reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden, sodass sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die POx konzentriert wurde. Die Konjugation von aDEC205 an POx wurde mittels verschiedener physiko-chemischer Methoden (UV-VIS, SDS-PAGE, FCS, GPC, CLSM und FACS) gezeigt. Mit Hilfe von „Specific-Hybridization-Internalisation-Sensor“ Experimenten konnte eine spezifische Aufnahme des Konjugats in CD8+ DCs nachgewiesen werden.

Die Konjugation von Antigen und CpG erfolgte ebenso nach entsprechender Modifizierung über kupferfreie Click-Chemie. SDS-PAGE, UV-VIS und FCS bestätigten eine erfolgreiche Kopplung. T-Zell-Proliferationsversuche ergaben für Antigen enthaltende Polymer-Konjugate eine CD8+ T-Zell-Aktivierung. Des Weiteren zeigten die POx keine bemerkenswerte Toxizität und deren Konjugate keine Aggregation in humanem Serum.

Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Polymertopologien auf ihre Biodistribution sowie Blutzirkulation untersucht. Für die nach GPC-Fraktionierung erhaltenen verschiedenen Polymerfraktionen - hochmolekulare wurmartige Polymerbürsten, ellipsoidartige Polymerbürsten und niedermolekulare kugelförmige Moleküle - konnten vielversprechende Ergebnisse erhalten werden.

## Summary

In the last decades polymer therapeutics have been widely investigated as polymeric bioconjugates proved to be promising candidates for the development of novel cancer immunotherapeutics. The ideal polymeric bioconjugate has a size range between 10 and 100 nm, is not cytotoxic and shows no aggregation behavior in human blood serum.<sup>[148]</sup>

The present work investigates the synthesis and characterization of polymer-drug-antibody conjugates and their application in cancer immunotherapy.

The first aim was it to identify appropriate polymeric carriers for *in vivo* applications. For this purpose, first the stability in human serum of different potential polymers (nanohydrogels, succinylated poly-*L*-lysine(brushes), ELP-brushes and poly(2-oxazoline)brushes) was investigated and the unspecific uptake in murine dendritic cells (DCs) was analysed. It has been demonstrated, that most notably neutral/zwitterionic particles are stable in human serum and are not internalized by DCs.

A bioconjugate was developed that is designed to target DCs of the immune system and to induce an immune response against a certain type of cancer cells.

These systems consist of succinylated poly-*L*-lysines or azide-functionalized poly(2-oxazoline)brushes (POx), because they show no or marginally unspecific uptake in cells. Specific cell targeting is achieved via the DEC205 receptor (CD8+) for the antiDEC205 antibody. The bioactive components additionally conjugated to the same polymer chain are a tumor associated antigen (TAA) with the core peptide sequence SIINFEKL inducing a specific immune response and also an immune-activating TLR9 ligand, CpG1826.

The components were conjugated sequentially to fluorescently labeled polymers for *in vitro* studies. AntiDEC205 antibody was covalently attached to the polymer after being modified with the heterobifunctional crosslinker DIBO-NHS via copper-free click chemistry. With an optimized method it was possible to isolate DIBO-modified antibody aDEC205, which was monomeric and free of aggregates. For the succinylated poly-*L*-lysines no explicit and reproducible results could be achieved. Thus in the further course of this work POx was used as polymeric carrier. Successful conjugation of aDEC205 was shown by different physico-chemical methods (UV-VIS, SDS-PAGE, FCS, GPC, CLSM and FACS) and with "specific-hybridization-internalisation-sensor"-experiments a specific uptake in CD8+ DCs was demonstrated.

Fluorescently labeled antigen-representing peptide and CpG1826 were end-functionalized by DBCO and linked to POx via copper-free azide coupling prior to AntiDEC205 conjugation. SDS-PAGE, UV-VIS and FCS indicated successful coupling. T-cell proliferation assays show an activation of CD8+-T-cells for conjugates containing antigen.

Furthermore, the POx brushes showed no remarkable cytotoxicity and their conjugates did not aggregate in human blood serum.

Moreover the influence of different polymer topologies on the biodistribution and blood circulation times was investigated. For the different polymer fractions – high molecular weight wormlike brushes, ellipsoids and the low molecular weight spheres – promising results could be achieved.

# Inhalt

1	Einleitung .....	1
2	Zielsetzung .....	3
3	Theoretischer Hintergrund .....	5
3.1	Immunsystem .....	5
3.1.1	Angeborene Immunität .....	5
3.1.2	Adaptive Immunität.....	6
3.2	Dendritische Zellen .....	8
3.2.1	Heterogenität der DCs .....	9
3.2.2	Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation.....	10
3.2.3	Aktivierung von dendritischen Zellen.....	12
3.2.4	DC basierte Krebsimmuntherapie .....	13
3.3	C-Typ Lektin Rezeptor DEC205 .....	15
3.4	Antigen SIINFEKL .....	16
3.5	Ajduvans CpG .....	17
3.6	Poly(2-oxazoline).....	18
4	Charakterisierungsmethoden.....	21
4.1	UV-VIS Spektroskopie .....	21
4.2	NMR Spektroskopie .....	21
4.3	Gelelektrophorese .....	22
4.4	Lichtstreuung .....	23
4.4.1	Statische Lichtstreuung (SLS).....	23
4.4.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	24
4.5	Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	28
4.6	Fluoreszenzspektroskopie .....	29
4.7	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).....	31
4.8	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) .....	34
4.9	Durchflusszytometrie (FACS) .....	35
4.10	„Specific Hybridization Internalization Probe“ (SHIP) .....	37
5	Ergebnisse und Diskussion.....	39
5.1	Untersuchung der Aggregation von kationisch geladenen Nanopartikeln in humanem Serum .....	39
5.1.1	Identifizierung der aggregatverursachenden Serumkomponenten .....	41
5.1.2	Beladung der kationischen Nanohydrogelpartikel mit siRNA .....	43

5.1.3	Zusammenfassung .....	47
5.2	Weitere polymere Trägersysteme für biomedizinische Anwendungen .....	49
5.2.1	Polymeranaloge Succinylierung von Poly- <i>L</i> -Lysin (PLL) .....	49
5.2.2	Succinylierte-Poly- <i>L</i> -Lysin-Bürsten (Succ-PLL-Bürste).....	56
5.2.3	Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten.....	59
5.2.4	Poly(2-oxazolin)bürsten .....	61
5.2.5	Zusammenfassung .....	68
5.3	Charakterisierung sowie Modifizierung des Antikörpers aDEC205 .....	71
5.3.1	Untersuchung von aDEC205 nach unterschiedlicher Filtration mittels DLS.....	71
5.3.2	Farbstoffmarkierung von aDEC205 .....	72
5.3.3	DBCO-Markierung von aDEC205.....	73
5.3.4	Zusammenfassung .....	76
5.4	Polymerkonjugate .....	77
5.4.1	PLL-aDEC205, Succ-PLL-aDEC205 und Succ-PLL-Bürste-aDEC205 .....	77
5.4.2	Poly(2-oxazolin)bürste-aDEC205 .....	82
5.4.3	Internalisierungskinetik SHIP .....	100
5.4.4	Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen .....	108
5.4.5	Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen-aDEC205.....	111
5.4.6	Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen-CpG-Antikörper(aDEC205 bzw. aCD11c).....	113
5.4.7	Untersuchung des Einflusses von CpG auf die Zellanbindung.....	114
5.4.8	Intrazelluläre Lokalisierungsexperimente.....	119
5.4.9	T-Zell Proliferation .....	123
5.5	Biodistribution der Poly(2-oxazolin)bürsten .....	131
5.5.1	MTT-Toxizitätstest .....	131
5.5.2	Fraktionierung der Poly(2-oxazolin)bürsten.....	132
5.5.3	Biodistribution der verschiedenen Poly(2-oxazolin)-Fraktionen.....	135
5.5.4	Zusammenfassung .....	140
6	Zusammenfassung .....	141
7	Experimenteller Teil .....	145
7.1	Chemikalien.....	145
7.2	Dialyse .....	147
7.3	Gelelektrophorese (SDS Page) .....	147
7.4	TNBSA-Test zur Quantifizierung von primären Aminen.....	147
7.5	Synthesen zu Kapitel 5 .....	148

7.5.1	Succinylierung von Poly-L-lysin (PLL) und der Poly-L-lysin-Bürste (PLL-B_55-3-2) .....	148
7.5.2	Farbstoffmarkierung des Antikörpers aDEC205 .....	151
7.5.3	Farbstoffmarkierung der Polymere .....	152
7.5.4	Farbstoffmarkierung des Antigens .....	155
7.5.5	Funktionalisierung von aDEC205 .....	155
7.5.6	Konjugation von aDEC205 an PLL, 37%-Succ-PLL und 37%-Succ-PLL-B .....	156
7.5.7	Konjugation von aDEC205 an Azid-funktionalisierte Polymere .....	157
7.5.8	Konjugation von Antigen-AF546 (SIINFEKL) und anschließende Konjugation von aDEC205 an die N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste.....	158
7.5.9	Konjugation von CpG1826-DBCO (IBA Germany) an die N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste .....	158
7.5.10	Konjugation von CpG1826-DBCO (IBA Germany), Antigen(SIINFEKL)-DBCO und aDEC205/aCD11c an die N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste.....	159
7.5.11	Polymer-SHIP Konjugate.....	160
7.6	Protokoll zur Isolation von dendritischen Zellen .....	162
7.7	SHIP-Internalisierungsprotokoll .....	164
7.8	T-Zell Proliferationsversuch .....	165
7.9	Zelllokalisierungsexperimente .....	167
7.10	Probenvorbereitung für die Lichtstreuung (allgemein).....	169
7.11	Präparation der Serumproben für die DLS, DLS an Polymeren bzw. Nanopartikeln in Serum.....	169
7.12	Plasmafraktionierung.....	170
7.12.1	Präparative Isolierung von IgG über Protein-A Affinitätschromatographie ....	170
7.12.2	Präparative Isolierung von Albumin über AffiBlue Affinitätschromatographie .....	171
7.12.3	DEAE Anionenaustauschchromatographie .....	171
7.13	Verwendete Geräte und Methoden .....	172
8	Anhang.....	177
9	Literaturverzeichnis .....	193



## Abbkürzungsverzeichnis

AF	AlexaFluor
APC	„Antigen presenting Cell“
APC (Kanal-FACS)	„Allophycocyanin“
BHQ2	„Black hole quencher“
BMDC	„Bone marrow-derived dendritic cell“
BSA	„Bovine Serum Albumin“
BV	Brilliant violet
c	Konzentration
cDC	konventionelle dendritische Zelle
CD	„Cluster of differentiation“
CLSM	„Confocal laser scanning microscopy“
CLR	„C-type lectin receptor“
CPG-DNA	2'-Deoxy(cytidine phosphate guanosine)-DNA
CTL	„Cytotoxic T lymphocyte“
Cy	Cyanin
DC	Dendritische Zelle
DEC205	Rezeptor des aDEC205 Antikörpers
DBCO/DIBO	Dicyclobenzylcyclooctin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	„Fragment antigen-binding“
FACS	„Fluorescence associated cell sorting“
Fc	„Fragment crystallisable“
FCS	„Fluorescence correlation spectroscopy“
FCCS	„Fluorescence cross correlation spectroscopy“
FIP	„Fluorescence internalization probe“
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	„Forward scatter“
G	Guanosin
GM-CSF	„Granulocyte macrophage colony stimulating factor“
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HEK293	„Human embryonic kidney 293 cells“
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Lichtstreuung
mAb	Monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MHC	„Major histocompatibility complex“
MR	Mannose Rezeptor



MW	Molekulargewicht
N <sub>3</sub>	Azid
NHS	N-Hydroxysuccinimid, "Carboxylic Acid Succinimidyl Ester"
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NMR	„Nuclear magnetic resonance“
NP	Nanopartikel
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotid
OVA	Ovalbumin
PAMP	„Pathogen-associated molecular pattern“
PBS	„Phosphate buffered saline“
pDC	Plasmazytoide DC
PEG	Poly(ethylen glycol)
PLL	Poly-L-lysin (7500 g/mol)
PLL-B	Polylysinbürste (8*10 <sup>6</sup> g/mol)
Poly I:C	„Polyinosinic-polycytidylic acid“
POx	Polyoxazolin
PRR	„Pathogen recognition receptor“
PTO	Phosphothioatdeoxyribose Rückgrat
R <sub>g</sub>	Trägheitsradius
R <sub>h</sub>	Hydrodynamischer Radius
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raustemperatur
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“
SH	Thiol
SHIP	„Specific hybridization internalization probe“
SLS	Statische Lichtstreuung
SSC	„Side scatter“
ssDNA	„Single stranded DNA“
Succ-PLL	Succinyliertes PLL
TAA	„Tumor associated antigen“
TAP	„Transporter associated with antigen processing“
TCEP	„Tris(2-carboxethyl)phosphine“
TCR	T-Zell Rezeptor
T <sub>H</sub>	T-Helfer Zelle
TLR	„Toll-like receptor“
Treg	Regulatorische T-Zelle
UV/Vis	Ultraviolett/"Visible"
V	Volumen
VH	„Variable region of the heavy chain of an IgG“
VL	„Variable region of the light chain of an IgG“

## 1 Einleitung

Nach Angaben der „International Agency for Research on Cancer“ der „World Health Organization“ sind im Jahr 2012 weltweit 14,1 Millionen Menschen neu an Krebs erkrankt und 8,2 Millionen Patienten an Krebs gestorben.<sup>[1]</sup>

Medizinisch gesehen handelt es sich bei der Erkrankung Krebs um maligne (bösartige) Tumore und bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems (Hämoblastosen). Diese entstehen durch eine unkontrollierte Vermehrung und Teilung von mutierten/malignen Körperzellen, die in der Lage sind gesunde Zellen zu zerstören.<sup>[2]</sup>

Derzeitige therapeutische Methoden zur Behandlung von Krebs sind operative Entfernungen der Tumore, die meist in Kombination mit Chemotherapien oder Bestrahlungen durchgeführt werden. Die beiden letzteren Methoden töten aufgrund ihrer Unspezifität neben den Krebszellen auch gesunde Zellen ab und führen somit beim Patienten zu unerwünschten Nebenwirkungen.<sup>[3, 4]</sup> Zudem kann in Folge der unselektiven Wirkung die Dosierung der Therapeutika schwer eingestellt werden.

Ein hohes Potential zur Verbesserung dieses Dilemmas erkannte H. Ringsdorf im Jahre 1975 durch die Anwendung polymerer Wirkstoff-Trägersysteme.<sup>[5]</sup> Die funktionellen Gruppen des polymeren Trägersystems erlauben eine parallele Anbindung von therapeutischen bzw. zytotoxischen Molekülen und Targeting-Molekülen (z.B. monoklonale Antikörper). Dies gewährleistet einen zielgerichteten Transport hochdosierter und ansonsten schlecht löslicher Therapeutika, wobei auch deren Blutzirkulationszeit erhöht werden kann.<sup>[4, 6]</sup>

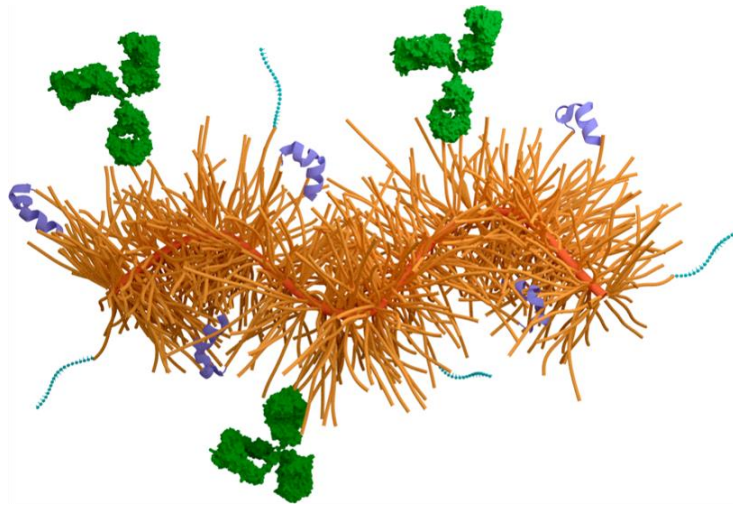
Um die Verwendung toxischer Therapeutika einzuschränken und langfristige Erfolge gegen den Krebs zu erzielen, setzt die Krebsimmuntherapie auf die Induktion einer körpereigenen Immunantwort. Das Hauptprinzip besteht darin, das Immunsystem mit Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) zu stimulieren. Diese Antigene können auf der Zelloberfläche von Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) den Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Durch die Erkennung des Antigens von den Zellen des Immunsystems wird eine wirkungsvolle Immunantwort ausgelöst, welche durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses einen lebenslänglichen Schutz gegen Krebs bezwecken könnte.<sup>[7]</sup> Der Vorteil dieser Therapie ist somit ihre gute Verträglichkeit und Dauerhaftigkeit (adaptive Immunität).

Zur Generierung einer lebenslänglichen Immunität gegenüber Krebszellen sollten am besten dendritische Zellen (DC) adressiert werden, da diese aufgrund ihres effizienten Antigen präsentierenden Charakters in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren.<sup>[7]</sup>

Um eine erfolgreiche Immuntherapie zu garantieren, müssen erneut Methoden zur gezielten DC Beladung und Aktivierung etabliert werden. Hierzu kann erneut das von H. Ringsdorf postulierte Prinzip polyfunktioneller Polymerträger Anwendung finden, nun aber bestehend aus Polymer, Antigen, Adjuvans und Antikörper. In ersten Vorarbeiten konnten diesbezüglich erste Konjugate auf Basis des Polymers Poly-L-lysin entwickelt werden.<sup>[8]</sup> Es hat sich aber herausgestellt, dass für dieses System infolge der hohen unspezifischen Aufnahme des hochgradig kationischen Polymers in die Zellen keine gezielte zellspezifische Antikörpervermittelte Internalisierung der Konjugate erzielt werden kann. Für die Anwendung polymerer Trägersysteme zur spezifischen Adressierung von DCs eignen sich folglich nur solche Polymere, welche keine oder nur geringe unspezifische Zellaufnahme zeigen.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung eines 4-Komponentensystems bestehend aus Antikörper, Antigen, Adjuvans und Polymer zur potentiellen Anwendung als Antitumorvakzine in der Krebsimmuntherapie (Abbildung 2-1). Die Idee zur Synthese eines solchen Antikörper-Antigen-Adjuvans-Polymer Konjugats gründet auf der Annahme, dass für eine starke sowie dauerhafte Immunreaktion eine gleichzeitige Verabreichung von Antigen und Adjuvans am gleichen Ort vorausgesetzt wird.<sup>[9]</sup>



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung eines Polymerbürsten-Antigen-CpG-Antikörper Konjugats: orange-Polymerrückgrat; braun-Polymerseitenketten; blau-Antigen; türkis-Adjuvans (CpG); grün-Antikörper**

Um die Eignung verschiedener Polymere als mögliche Trägersysteme im menschlichen Körper beurteilen zu können, sollen diese als erstes hinsichtlich ihrer Biokompatibilität durch Toxizitätstests und dynamische Lichtstreuungsmessungen in humanem Serum untersucht werden.<sup>[144]</sup>

Im nächsten Schritt soll eine geeignete Strategie zur Synthese des 4-Komponentensystems aufbauend auf Arbeiten von [REDACTED] etabliert werden.<sup>[8]</sup>

Hierzu steht vor allem die Konjugation des Antikörpers (aDEC205) im Vordergrund. Um eine Arbeitsmethodik für die Synthese und Charakterisierung am einfacheren Modell zu entwickeln, wird im Rahmen dieser Arbeit lineares Poly-L-lysin (PLL) bzw. lineares succinyliertes PLL (succ-PLL) eingesetzt. Diese Methodik soll anschließend auf die verschiedenen Polymerbürsten (succinylierte PLL-Bürsten und Poly(2-oxazolin)bürsten) übertragen werden. Wesentliche Voraussetzung für die Konjugation von bioaktiven

Komponenten und besonders eines Antikörpers, als chemisch multifunktionellem Biomolekül, ist der sukzessive Einsatz mehrerer Konjugationsmethoden mit bioorthogonaler Reaktionsführung.

Die Konjugation des Antikörpers soll nach Modifikation mittels des heterobifunktionellen Linkers Dibenzocyclooctin (DIBO bzw. DBCO) über kupferfreie Click-Chemie erfolgen. Wesentlich für den Erfolg des Projekts ist die Konjugation von aggregatfreiem, also unimerem Antikörper. Die Lichtstreuung mit ihrer hohen Sensitivität in der Detektion von Aggregaten soll die Etablierung einer aggregationsfreien Präparation erlauben.

Das Antigen (SIINFEKL) sowie das Adjuvans (CpG1826) sollen ebenso nach entsprechender Modifikation über kupferfreie Click-Chemie an das Polymer angebunden werden.

Für die Untersuchung der Konjugationseffizienz wird die UV-VIS Spektroskopie verwendet. Zur weiteren Charakterisierung dienen die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und die Gelelektrophorese. Die Internalisierung in die Zellen soll mit Hilfe der Durchflusszytometrie (als Ensemble-Messung) und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (als Einzellzell-Messung) analysiert werden. Das Vermögen zur T-Zell Aktivierung wird anhand eines Versuchs zur T-Zell Proliferation überprüft.

Von weiterem Interesse ist das *in vivo* Verhalten verschiedener Polymertopologien. Hierbei sollen Effekte wie Größe und Form bezüglich ihrer Biodistribution und Blutzirkulationszeit untersucht werden.

## 3 Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Immunsystem

Das Immunsystem erstreckt sich über mehrere Organe unseres Körpers und schützt uns vor Krankheitserregern, entarteten Zellen und Toxinen. Prinzipiell wird es in die angeborene und erworbene (adaptive) Immunität unterteilt (Abbildung 3-1).<sup>[11]</sup>

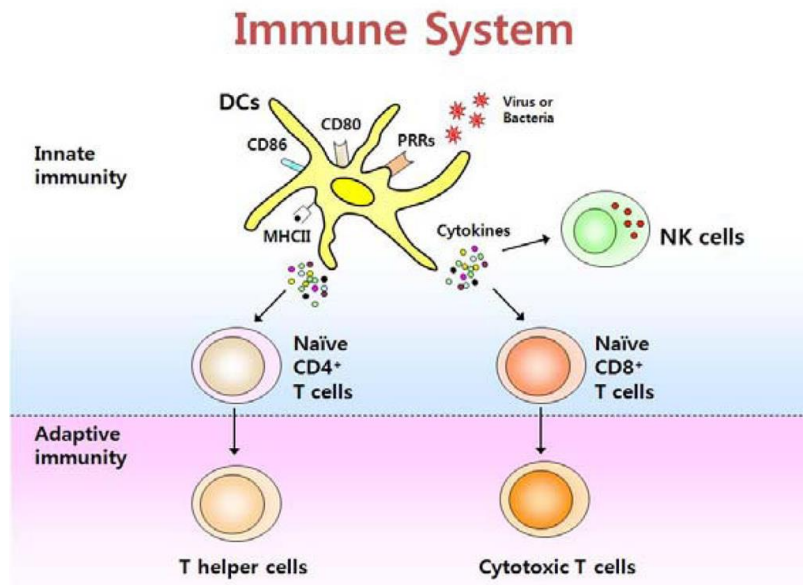


Abbildung 3-1: Komponenten der angeborenen und erworbenen Immunität<sup>[12]</sup>

#### 3.1.1 Angeborene Immunität

Eine erste Abwehr gegenüber eindringenden Mikroorganismen sind physikalische und chemische Barrieren. Hierzu gehören beispielsweise die Haut mit ihrem sauren Schutzmantel und bestimmte Zellen des angeborenen Immunsystems<sup>[11]</sup>. Neben dem Komplementsystem zählen die Immunzellen - Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und natürliche Killerzellen (NK) - zur angeborenen Immunität.<sup>[13]</sup> Viele Mikroorganismen, zum Beispiel mannosereiche Oligosaccharide, Proteoglykane, Lipopolysaccharide und nichtmethylierte CpG-DNA, können anhand von regelmäßiger Muster, sogenannter Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMP), erkannt werden<sup>[11]</sup>.

Zur Erkennung dienen Mustererkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“ PRR), welche vor allem von Makrophagen und DCs exprimiert werden. Zu diesen PRR werden die auf der Zelloberfläche oder im Endosom exprimierten Toll-Like Rezeptoren (TLR) gezählt.

Durch eine PRR-Aktivierung werden Zytokine, Typ I Interferone und Chemokine - Botenstoffe des Immunsystems – sezerniert und lösen dadurch eine schnelle unspezifische Immunantwort aus.<sup>[14]</sup>

In Folge der Vermittlung von DCs wirkt sich die angeborene Immunantwort entscheidend auf die Einleitung der adaptiven Immunantwort aus.<sup>[11]</sup>

#### **3.1.2 Adaptive Immunität**

Die adaptive Immunität wird durch die B-Lymphozyten (humorale Immunität) und T-Lymphozyten (zellvermittelte Immunität) als auch durch die von ihnen hergestellten Effektormoleküle gekennzeichnet. Im Gegensatz zur schnellen unspezifischen angeborenen Immunantwort zeichnet sich die adaptive Immunantwort durch ihre hohe Antigen-spezifität und Präzision aus.<sup>[15]</sup> Die Zellen des adaptiven Immunsystems bilden ein immunologisches Gedächtnis aus, wodurch bei einer erneuten Infektion eine schnellere und stärkere Immunantwort erzeugt wird.<sup>[16, 17]</sup>

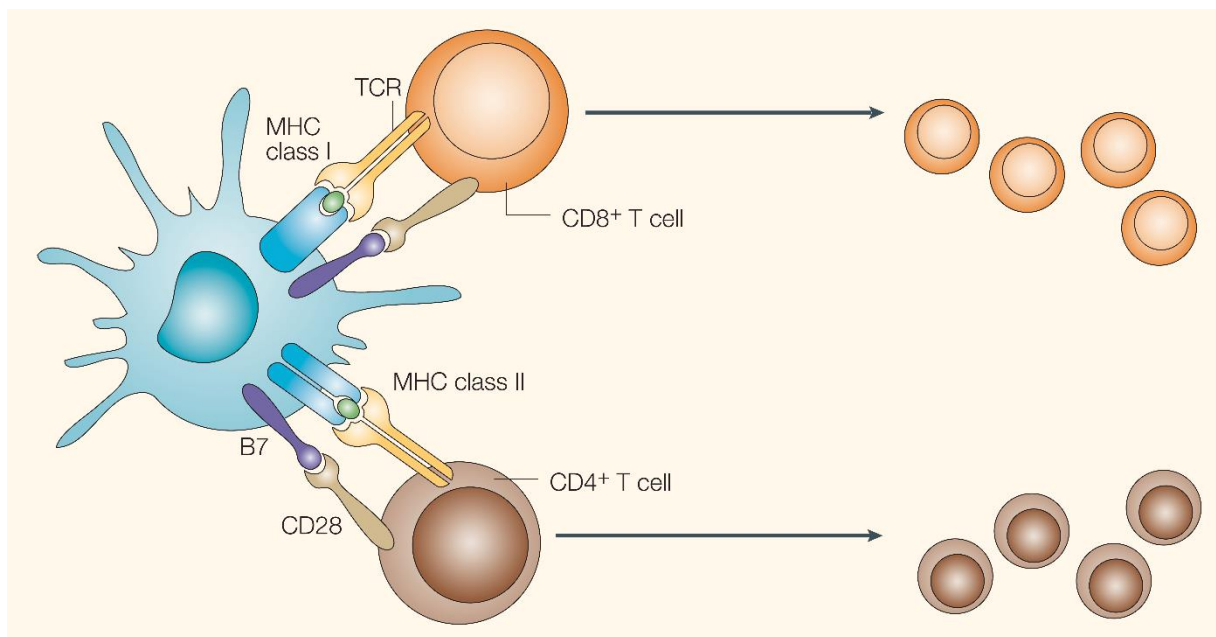
Die T- und B-Lymphozyten werden ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen gebildet.<sup>[18, 19]</sup> Die weitere Reifung findet in den primären lymphatischen Organen, im Thymus (T-Zellen) oder im Knochenmark (B-Zellen) statt.<sup>[11]</sup> Ausgehend von den primären Lymphorganen bewegen sich die frisch gebildeten Lymphozyten in Richtung sekundärer Lymphorgane (Milz, periphere Lymphorgane, Mandeln, Nasenrachenmandeln und den Peyerschen Plaques im Darm).

Hier erfolgt die Antigenpräsentation und demzufolge die Induktion der adaptiven Immunantwort.<sup>[20]</sup> Dabei spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems (insbesondere DCs und Makrophagen) aufgrund ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation eine wichtige Rolle. Aber auch die B-Zellen des adaptiven Immunsystems weisen diese Fähigkeit auf. Diese Zellen werden demnach als professionelle antigenpräsentierende Zellen („antigen presenting cells“, APCs) bezeichnet. Hierunter kommt den DCs die größte Bedeutung zu, da von ihnen schon sehr wenige Zellen ausreichen, verglichen mit Makrophagen und B-Zellen, um eine T-Zell Antwort zu induzieren.<sup>[21-23]</sup>

Zur Anregung einer T-Zellproliferation mit einer Differenzierung in Effektor T-Zellen muss das T-Zell-spezifische Peptid (Antigen) von den APCs aufgenommen, prozessiert und auf Molekülen des körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histo-

compatibility complex“, MHC) den T-Zellen präsentiert werden.<sup>[24]</sup> Des Weiteren sind zur Aktivierung einer T-Zelle kostimulatorische Signale notwendig.<sup>[25]</sup>

T-Lymphozyten werden in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen unterteilt und können mit Hilfe von spezifischen T-Zell Rezeptoren (TCR) an den Komplex bestehend aus Antigen (Peptid) und MHC-Molekül binden. Die CD4+ T-Zellen werden von Antigenen (Peptiden) auf MHC-II Molekülen und die CD8+ T-Zellen von Antigenen (Peptiden) auf MHC-I Molekülen aktiviert (Abbildung 3-2). Die zur Aktivierung von T-Lymphozyten notwendigen Signale werden durch die Bindung von den auf der Oberfläche von APCs exprimierten kostimulatorischen Molekülen (CD80/86 oder CD40) an T-Zell Rezeptoren (CD28) geliefert.<sup>[26]</sup> Ohne diese kostimulatorischen Signale werden die T-Zellen nicht aktiviert und verfallen in einen anergischen Zustand.<sup>[27]</sup>



**Abbildung 3-2: Schematische Darstellung zu Aktivierung von T-Zellen<sup>[28]</sup>**

Die Aktivierung naiver CD8+ T-Zellen führt zur Differenzierung in zytotoxische Effektorzellen, welche entartete Zellen erkennen und abtöten.<sup>[11]</sup> Weiterhin werden langlebige Gedächtniszellen ausgebildet, welche nach wiederholter Berührung mit dem Pathogen wieder sehr schnell zu Effektorzellen differenzieren.<sup>[29]</sup>

Im Gegensatz dazu können die CD4+ T-Zellen verschiedene Differenzierungswege eingehen und demnach unterschiedliche Effektorzellen mit verschiedenen immunologischen Funktionen bilden. Die wichtigsten CD4+-Untergruppen (Einteilung über Zytokinproduktion)



sind die  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ - und  $T_{reg}$ -Zellen.  $T_{H1}$ -Zellen sind für die Herstellung von IFN- $\gamma$  zuständig und spielen für Makrophagen sowie für CD8+ T-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der Phagozytose eine wichtige Rolle. Die von  $T_{H2}$ -Zellen gebildeten Interleukine (IL-4, IL-5, IL-13 und IL-25) geben instruierende Signale zur Produktion von Antikörpern aus B-Zellen und unterstützen somit die humorale Immunantwort. Die Interleukine (IL-17A, IL-17F und IL-22), welche von  $T_{H17}$ -Zellen hergestellt werden, dienen zur Stimulation der Produktion und Reifung neutrophiler Granulozyten. [26]

Die Aufgabe der  $T_{reg}$ -Zellen ist es die Immunaktivierung zu unterdrücken. Dies kann beispielsweise durch die Konsumierung des Wachstumsfaktors IL-2, der zum Überleben aktivierter T-Zellen notwendig ist, geschehen. Weiterhin können  $T_{reg}$ -Zellen immunsuppressive Zytokine wie beispielsweise IL-10 ausschütten. [26]

## 3.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden im Jahr 1868 von Langerhans als Zellen in der Haut entdeckt. Ihre immunologische Funktion konnte jedoch erst im Jahr 1973 von Steinmann und Cohn beschrieben werden. [22, 30] Aufgrund ihrer individuellen Zytoplasmaausläufer (Dendriten, Abbildung 3-3) werden diese Zellen als dendritische Zellen bezeichnet. [22]

DCs liegen im peripheren Gewebe als unreife Zellen vor und sind darauf spezialisiert das Gewebe nach Pathogenen zu durchsuchen und diese nach Aufnahme zu prozessieren sowie zu präsentieren. [31]

Demnach werden DCs als Wächterzellen des Immunsystems bezeichnet und bilden als professionelle APC das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. [32]

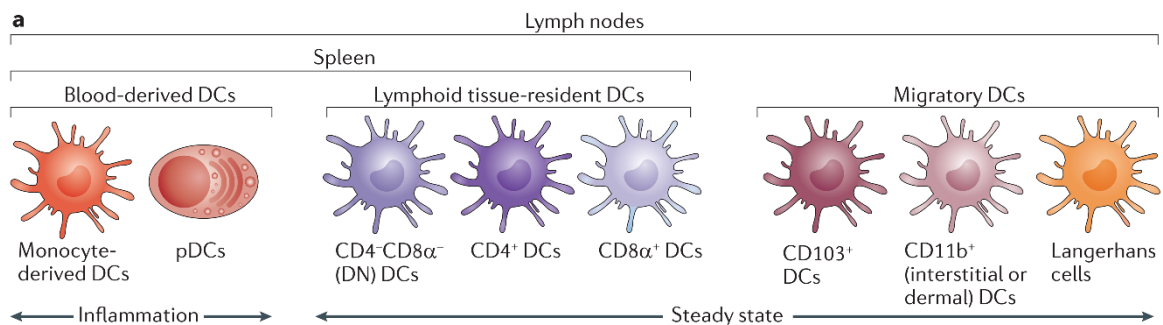


Abbildung 3-3: Dendritische Knochenmarkszellen [33]

### 3.2.1 Heterogenität der DCs

DCs weisen eine sehr heterogene Population auf und lassen sich anhand von verschiedenen exprimierten Oberflächenmolekülen, ihrer Lokalisation und Funktion charakterisieren.<sup>[34, 35]</sup> Vereinfacht lassen sich DCs in zwei Hauptgruppen einteilen: Plasmazytoide- (pDCs) und konventionelle DCs (cDCs). Die Rolle der pDCs bei der Antigen-Präsentation sowie der damit verbundenen Stimulation der T-Zellen ist noch nicht geklärt. Bekannt ist jedoch ihre Fähigkeit zur Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN), wodurch sie bei einer viralen Infektion von großer Bedeutung sind.<sup>[31, 36, 37]</sup> In dieser Arbeit liegt aber das Augenmerk in erster Linie auf cDCs.

Die cDCs der Milz, der Lymphknoten und im Thymus lassen sich in fünf Populationen unterteilen. Diese können anhand ihres Aufnahmeweges in die sekundären lymphoiden Organe noch einmal in zwei Gruppen unterteilt werden.<sup>[38]</sup>



**Abbildung 3-4: Subpopulationen dendritischer Zellen<sup>[39]</sup>**

Als erstes sind hier die migratorischen DCs zu nennen. Diese entwickeln sich aus Vorläuferzellen in peripheren Geweben und wandern durch die afferente Lymphe zu den lokalen drainierenden Lymphknoten.<sup>[40]</sup> Da die Milz und der Thymus keine afferenten Lymphgefäße aufweisen, ist diese Art von DCs in diesen beiden Organen kaum oder gar nicht vorhanden. Die migratorischen DCs lassen sich zusätzlich in interstitielle DCs und Langerhans Zellen unterteilen.

Zur zweiten Hauptgruppe zählen die DCs, welche über den Blutkreislauf den Weg in die lymphatischen Organe (Milz, Thymus und Lymphknoten) finden.<sup>[38]</sup> Diese können weiter in die folgenden drei Subtypen unterteilt werden: CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> DCs, CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> DCs und CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> DCs<sup>[31, 41]</sup>. In der Milz und in den Lymphknoten lassen sich weitere Subtypen differenzieren.

Die zwei wichtigsten Subtypen der Milz sind die in der Umgebung von T-Zellen befindlichen CD8+CD205+ DCs und die in der roten Pulpa vorhandenen CD8-33D1+ DCs. Die Subtypen der Lymphknoten sind CD8+CD205+ DCs und CD8-CD11b+ DCs.<sup>[42]</sup>

#### 3.2.2 Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation

DCs können Antigene aus ihrer Umgebung über verschiedene Mechanismen – Makropinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose – aufnehmen.<sup>[43, 44]</sup>

Für die spezifische rezeptorvermittelte Endozytose besitzen DCs eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren. Zu diesen zählen vor allem C-Typ-Lektine (Glykorezeptoren) wie LY75 (DEC-205/CD205), Mannose Rezeptor MRC1/CD206, DC-SIGN/CD209, Langerin/CD207, ASGPR, OLR1/LOX-1 und CLEC4A/DCIR.<sup>[45, 46]</sup>

Die aufgenommenen Antigene werden prozessiert, deren Peptidfragmente in die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC-I oder MHC-II) eingebaut und an der Zelloberfläche den T-Zellen präsentiert (Abbildung 3-5). Hierbei sind die an MHC-II Molekülen gebundenen und den CD4+ T-Zellen präsentierten Peptide meist von extrazellulärer Herkunft und die an MHC-I Molekülen gebundenen und den CD8+ T-Zellen präsentierten Antigene von intrazellulärer Abstammung. Darüber hinaus besitzen bestimmte Zellen das Vermögen, exogene Antigene in MHC-I Komplexen an der Zelloberfläche zu präsentieren (Abbildung 3-5). Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation (engl. „cross-presentation“) beschrieben und ist ausschlaggebend für die Induzierung zytotoxischer T-Zellen und der damit verbundenen effizienten Immunität.<sup>[31, 47]</sup>

Zur Kreuzpräsentation sind vor allem die CD8+ DCs befähigt<sup>[48]</sup>, während CD8- DCs eine stärkere CD4+ T-Zell Antwort induzieren.<sup>[49]</sup> Mehrere *in vivo* Studien haben jedoch auch gezeigt, dass CD8- DCs die Kreuzpräsentation unterstützen und somit eine wichtige Rolle in der Kreuzpräsentation spielen.<sup>[50]</sup>

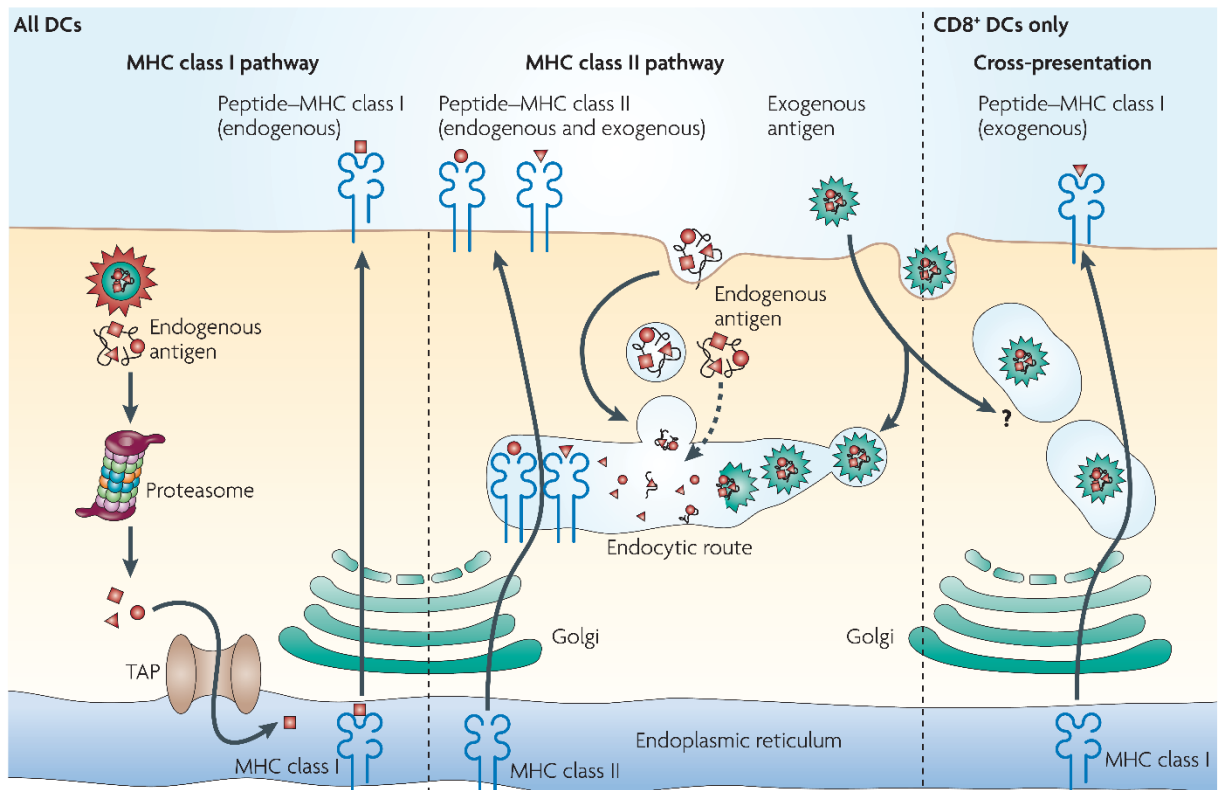


Abbildung 3-5: Wege der Antigenpräsentation in DCs<sup>[31]</sup>

Bei der klassischen Antigenpräsentation auf MHC-I Molekülen wird das endogene Polypeptid durch das Proteasom im Cytosol degradiert<sup>[51]</sup>. Die Peptide werden im Anschluss mit Hilfe von „transporter associated with antigen processing“ (TAP) Molekülen in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Im ER werden die Peptide in die MHC-I Komplexe mit eingebaut und anschließend über den Golgi-Apparat entlang des sekretorischen Wegs an die Zelloberfläche gebracht, wo sie von CD8+ T-Zellen detektiert werden können.<sup>[52]</sup>

Die Kreuzpräsentation wurde 1976 das erste Mal von Bevon<sup>[53]</sup> beschrieben, aber bis heute sind die intrazellulären Prozesse noch nicht vollständig verstanden. Villadangos et al. beschreiben die MHC-I Kreuzpräsentation wie folgt:<sup>[52]</sup> Exogene Antigene, welche über die bereits oben erwähnten Wege (Pinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose) internalisiert werden können, müssen zur Kreuzpräsentation die gleichen Stationen in der Zelle durchlaufen wie die endogenen Peptide: Prozessierung, Beladung auf die MHC-I Moleküle und der Transport zur Zelloberfläche. In der Regel wird bei der Kreuzpräsentation zwischen zwei Wegen unterschieden.<sup>[54]</sup>

Beim endozytotischen Weg finden die Verarbeitung und die Beladung im endosomalen Kompartiment statt. Beim cytosolischen Weg werden Antigene zur Verarbeitung vom Endosom ins Cytosol verlagert, die anschließende Beladung erfolgt im ER und der Transport an die Zelloberfläche wieder über den sekretorischen Weg. Dieser Weg würde somit die Freisetzung der Antigene aus den endosomatischen Kompartimenten voraussetzen („lysosomal escape“).<sup>[55]</sup> Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass diese zwei Wege zu einfach sind. Der genaue Ort der einzelnen Stationen ist also abhängig von der Art des Antigens und des Endozytose Mechanismus und kann somit stark variieren.<sup>[56, 57]</sup>

#### 3.2.3 Aktivierung von dendritischen Zellen

Bei DCs wird allgemein zwischen reifen und unreifen Zellen unterschieden (Abbildung 3-6). Unreife DCs besitzen die Fähigkeit effektiv Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Da sie nur geringe Mengen an MHC-I und MHC-II Molekülen sowie kostimulatorische Moleküle wie zum Beispiel CD80 und CD86<sup>[58, 59]</sup> exprimieren, zeigen unreife DCs eine schwache Wechselwirkung mit T-Zellen.<sup>[49]</sup>

Demzufolge wird von unreifen DCs sehr oft anstelle einer T-Zell Immunantwort eine T-Zell Toleranz ausgelöst.<sup>[60-62]</sup>

Die Ausreifung von DCs geht neben einer morphologischen Änderung mit einer reduzierten Antigenaufnahme in Folge der Herunterregulierung der Makropinozytose einher.<sup>[63]</sup> Die Antigenaufnahme über Antikörper mittels rezeptorvermittelte Endozytose wird durch die Ausreifung nicht beeinträchtigt. Demnach können Antigene angebunden an einen monoklonalen Antikörper weiterhin von den Zellen aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden.<sup>[64]</sup>

Ferner ist die Ausreifung mit einer steigenden Effizienz in der Antigenprozessierung und einer vermehrten Expression von MHC-I- und MHC-II Molekülen sowie entsprechender kostimulatorischen Molekülen verbunden.<sup>[31]</sup>

Weiter kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Zytokinen und zur Hochregulierung des CCR7 Rezeptors, welcher die Wanderung der DCs in die Lymphknoten ermöglicht.<sup>[65]</sup>

Somit wird erst nach der Ausreifung aus einer Antigen aufnehmenden DC eine effektive Antigen präsentierende DC (APC).<sup>[43]</sup>

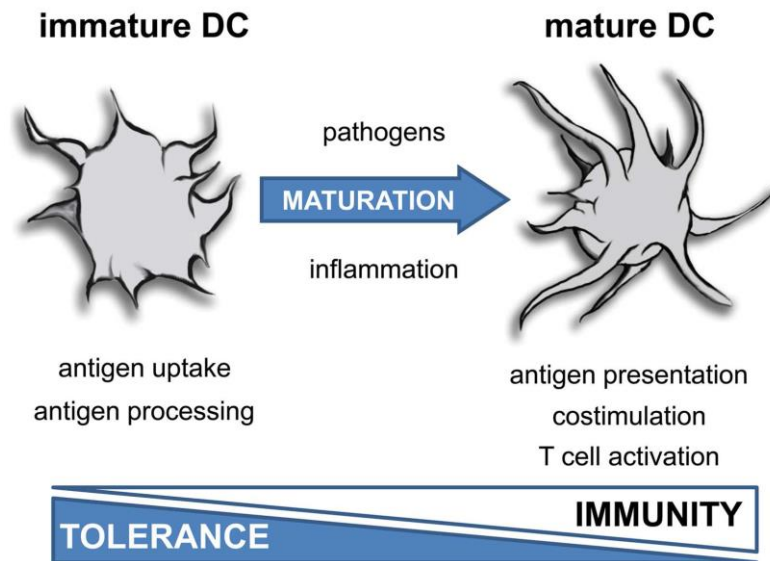


Abbildung 3-6: Unreife- sowie reife DCs und deren Funktionen<sup>[66]</sup>

Die Ausreifung von DCs wird über Pathogene und deren Nebenprodukte vermittelt. Experimentell kann die Ausreifung durch die Zugabe von Adjuvantien, wie beispielsweise antiCD40 Antikörper, poly I:C oder CpG Oligodesoxynukleotide, induziert werden. Während der Bedarf an Adjuvantien für die Induktion einer humoralen Immunantwort unterschiedlich ist,<sup>[67]</sup> werden für die Induktion einer zellulären Immunantwort, insbesondere für die Generierung von zytotoxischen T-Lymphozyt (CTL) Antworten, zweifellos Adjuvantien benötigt.<sup>[49]</sup>

### 3.2.4 DC basierte Krebsimmuntherapie<sup>[7]</sup>

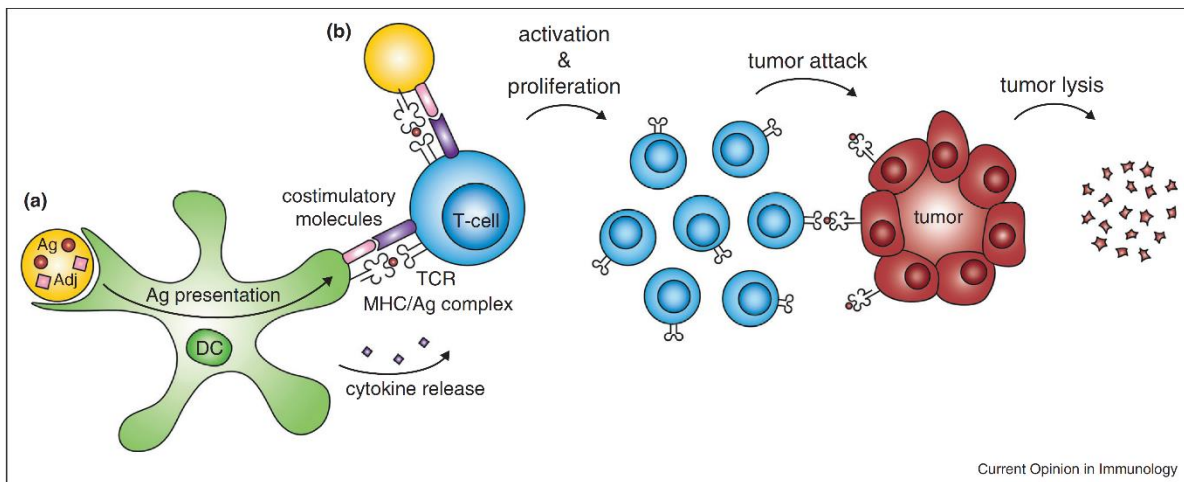
Die Krebsimmuntherapie stellt eine vielversprechende Behandlungsmethode, basierend auf der Anregung des Immunsystems zur Zerstörung von Tumorzellen, dar. Zur Erzeugung einer lang andauernden Immunität gegen Tumorzellen ist die Anregung von tumorspezifischen zytotoxischen Effektor- sowie Gedächtnis T-Zellen unumgänglich.<sup>[7]</sup>

Bislang gehen die meisten DC-basierten Krebsimmuntherapien mit einer *ex vivo* Beladung von DCs mit tumorassoziierten Antigenen (TAA) und immunstimulierenden Wirkstoffen (Adjuvantien) sowie deren anschließenden Injektion in den Patienten einher, um so eine T-Zell Aktivierung zu erhalten.<sup>[68]</sup> Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass autologe (körpereigene) Zellen benötigt werden, welche einen großen Labor- und Kostenaufwand mit sich bringen.

Eine bessere Methode stellt die direkte *in vivo* Beladung von DCs mit tumorassoziierten Antigenen und Ajuvantien dar, beispielsweise in Form von „Nanovaccinen“, in denen Antigen und Adjuvans gleichzeitig untergebracht sind (Abbildung 3-7).<sup>[7, 69]</sup>

Die meisten TAA, die bisher erforscht wurden, sind endogene Selbstantigene mit eingeschränkter Immunogenizität. Daher werden, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, für die Induktion einer Immunantwort stimulierende Adjuvantien (z.B. TLRs) benötigt.<sup>[70, 71]</sup>

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Antigen und Adjuvans in dasselbe Zellkompartiment sehr wichtig ist.<sup>[72]</sup>



**Abbildung 3-7: Auf DCs basierende Nanovaccine für die Krebsimmuntherapie<sup>[7]</sup>**

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Eignung von „Nanovaccinen“ in der Tumormimmuntherapie stellt deren Aufnahme in DCs dar. Hierbei wird zwischen passivem und aktivem Targeting unterschieden. Da DCs die Eigenschaft zur Phagozytose und Makropinozytose besitzen, wird allein durch die Anreicherung von „Nanovaccinen“ in DC-reiche Bereiche ein passives Targeting erhalten. Diese Art von Targeting ist sehr unspezifisch und demnach nicht für ein spezifisches Targeting von DCs geeignet. Ein weitaus besseres Targeting wird durch die Anbindung von Liganden, die spezifisch an Oberflächenrezeptoren dendritischer Zellen binden, erhalten (aktives Targeting). So konnte beispielsweise die Überlebensdauer von tumorbefallenen Mäusen durch das aktive Targeting von Tumorantigen-DNA enthaltenen Komplexen an CD40 oder MHC-II Rezeptoren von DCs deutlich verlängert werden.<sup>[73, 74]</sup>

In gleicher Weise stellen die von DCs sehr stark exprimierten C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) beliebte Zielstrukturen dar. An diese können eine Reihe von Antikörpern und Liganden, zum Beispiel aDEC205, CLEC9A, Langerin, DCIR2 und der Mannoserezeptor (MR) binden.<sup>[75]</sup>

Das für eine starke Immunantwort erforderliche spezifische Targeting bestimmter DC-Untergruppen wird durch die geeignete Wahl spezifischer CLRs erreicht. So wurde durch die Konjugation des Antikörpers aDEC205, Langerin oder CLEC9A eine gezielte Adressierung an CD8a+ MilzDCs erhalten. Die Anbindung des DCIR2 Antikörpers führte zu einem Targeting an CD8a- MilzDCs.<sup>[76]</sup>

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 diskutiert, sind die murinen CD8a+ DCs zur Kreuzpräsentation und damit verbunden zur Aktivierung von CD8+ tumorspezifischen CTLs befähigt.<sup>[77]</sup>

Tacke et al. zeigten, dass für PLGA-Partikel oder Liposomen, die an den aDEC205 Antikörper angebunden waren, deutlich geringere Mengen an Antigen für eine T-Zell Aktivierung ausreichten als für Partikel, welche nicht an einen Antikörper konjugiert waren.<sup>[70]</sup>

Demnach stellt die gezielte Adressierung von „Nanovaccinen“ an CD8a+ DCs eine vielversprechende Methode für die Krebsimmuntherapie dar.

### 3.3 C-Typ Lektin Rezeptor DEC205

DEC205 (CD205) zählt zur Gruppe der Makrophagen Mannose Rezeptor Familie der C-Typ I Lektin endozytotischen Rezeptoren.<sup>[78]</sup> Der strukturelle Aufbau von DEC205 zeichnet sich durch eine externe Cystein-reiche Domäne, gefolgt durch eine Fibronectin II Domäne und zehn anliegende C-Typ Lektin Bereiche aus.<sup>[21]</sup> Der cytosolische Bereich des DEC205 Rezeptors besitzt ein Tyrosin-basiertes Motiv, wodurch gebundenes Antigen durch Clathrin-bedeckte Vesikel in ein endosomales Kompartiment transportiert wird.<sup>[79, 80]</sup> DEC205 wird vor allem auf DCs in T-Zell Gebieten der Lymphorgane exprimiert<sup>[81, 82]</sup>.

Zum Antigen-Targeting von DCs können Antikörper, wie beispielsweise aDEC205, verwendet werden.<sup>[62]</sup>

Der Antikörper aDEC205 zählt zur Klasse der Immunglobuline (IgG), besitzt ein Molekulargewicht von 150 kDa und besteht zu 82% - 96% aus Proteinen und 4% - 18% aus Kohlenhydraten.<sup>[83]</sup>

IgG Antikörper sind aus vier Polypeptid Ketten aufgebaut: zwei schweren Ketten  $\gamma$  (jeweils 50 kDa) und zwei leichten Ketten,  $\kappa$  oder  $\lambda$ . (jeweils 25 kDa) (Abbildung 3-8). Diese sind über Disulfidbindungen miteinander verknüpft und bilden die typische Y-Form. Sowohl die intermolekularen als auch die intramolekularen Disulfidbrückenbindungen tragen zur Stabilität des Antikörpers bei.<sup>[84]</sup>



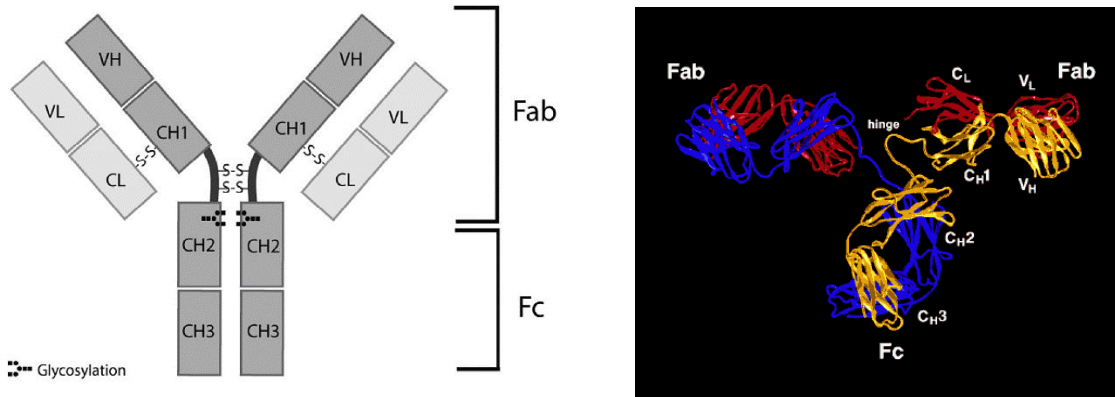


Abbildung 3-8: Struktur eines IgG Antikörpers<sup>[84, 85]</sup>

Die IgG Antikörper lassen sich in mehrere Domänen unterteilen: zwei Antigen-bindende Bereiche (Fab Fragment), die über eine flexible Region (Hinge) mit einem konstanten Bereich (Fc) verbunden sind. Die konstante Fc-Region stabilisiert das Molekül und ist an verschiedenen Effektorfunktionen – zum Beispiel Opsonierung oder Aktivierung des Komplementsystems – beteiligt.<sup>[83, 86]</sup>

### 3.4 Antigen SIINFEKL

Es gibt Tumor-Mausmodelle, bei denen die Tumorzellen Ovalbumin exprimieren. Daraus kann das tumorassoziierte OVA-Peptid als Antigen verwendet werden, da es bekanntermaßen von MHC-I Komplexen den CD8+ T-Zellen präsentiert wird. Das in dieser Arbeit verwendete Modelpeptid C-SGLEQLE-SIINFEKL mit der Kernsequenz SIINFEKL (Serin-Isoleucin-Isoleucin-Asparagin-Phenylalanin-Glutamin-Lysin-Leucin) ist ein solches tumorassoziiertes Peptid des Ovalbumins (OVA).<sup>[87]</sup>

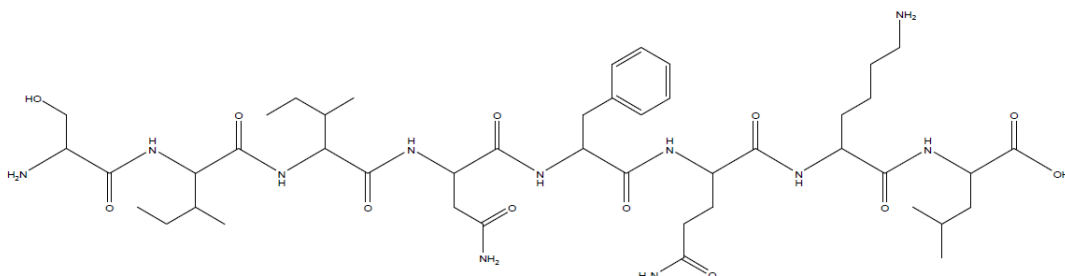


Abbildung 3-9: Strukturformel der Kernsequenz SIINFEKL

Die Vorsequenz SGLEQLE wird nach Aufnahme in die Zelle enzymatisch abgespalten.<sup>[88]</sup> Das Cystein am N-Terminus wird zur Konjugation an einen polymeren Träger genutzt.

Durch Vakzinierung mit nur kurzen Peptiden allein kann keine dauerhafte Immunantwort erzeugt werden. Kurze Peptide binden direkt von außen an MHC-I Moleküle, einschließlich den nicht professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Dies kann zur immunologischen Toleranz des Antigens führen, da es den B- und T-Zellen an kostimulatorischen Oberflächenmolekülen mangelt, die zur Generierung der Effektormoleküle notwendig sind.<sup>[89, 90]</sup> Dahingegen zeigen an einen Träger gebundene Antigene (z.B. Antikörper, Polymer) sowie sequenzverlängerte Peptide eine höhere Effizienz zur Induzierung einer langandauernden CD8+ T-Zell Immunität.<sup>[91, 92]</sup>

Diese ist auf die erforderliche Prozessierung langer Peptidsequenzen und deren anschließende Präsentation auf der Zelloberfläche von DCs zurückzuführen.<sup>[88, 92]</sup>

### 3.5 Adjuvans CpG

Bakterielle DNA sowie synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN), welche unmethylierte CpG Sequenzen (CpG ODN) enthalten, besitzen starke immunstimulatorische Effekte und werden demnach sehr oft als Adjuvantien für die Immuntherapie eingesetzt.<sup>[93]</sup>

Die Erkennung der CpG ODN erfolgt durch den TLR9 Rezeptor im späten endosomalen und lysosomalen Kompartiment.<sup>[94, 95]</sup>

Infolge der Bindung von CpG-ODN an TLR9 Rezeptoren kommt es zur Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen, verbunden mit einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86.<sup>[96]</sup>

Zudem wird die Bildung von entzündungsfördernden- und Th1-Cytokinen ausgelöst. Diese begünstigen die Aktivierung von CD4+ Th1 Zellen sowie cytotoxischer T-Lymphozyten.<sup>[97, 98]</sup>

CpG-ODN kommen in mehreren Klassen vor, die sich in ihrer Struktur (Nukleotidsequenz, CpG-Gehalt, Stabilisierung durch Phosphorothioatbindungen) und der Natur ihrer induzierten Immunantwort unterscheiden.<sup>[97, 99]</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete CpG1826 ist ein 20mer mit der DNA-Sequenz 5'-tcc atg acg ttc ctg acg tt-3' und zählt zur Klasse der B-ODN, welche einsträngig sind, ein Phosphorothioat-Rückgrat besitzen und die Fähigkeit zur Aktivierung von B-Zellen und DCs sowie zur Produktion von Zytokinen aufweisen.<sup>[93, 99]</sup>

Im Vergleich zu einem Phosphordiester-Rückgrat, welches durch Nukleasen abgebaut wird, zeichnet sich das Phosphorothioat-Rückgrat durch seine hohe Stabilität gegenüber diesen aus. Als Nachteil der Phosphorothioat-Bindungen sind erhöhte unspezifische Proteinwechsel-

wirkungen sowie unspezifische Bindung an Zelloberflächen und Oligonukleotid Rezeptoren zu nennen. Hierdurch kann es zu einer Zunahme der aktiven und passiven Zellaufnahme kommen.<sup>[100]</sup>

Zur Konjugation an einen polymeren Träger wird das CpG am 3`-Ende entsprechend funktionalisiert. Eine Konjugation am 5`-Ende hätte einen Verlust der immunstimulierenden Aktivität über TLR9-Aktivierung zur Folge.<sup>[101, 102]</sup>

### 3.6 Poly(2-oxazoline)

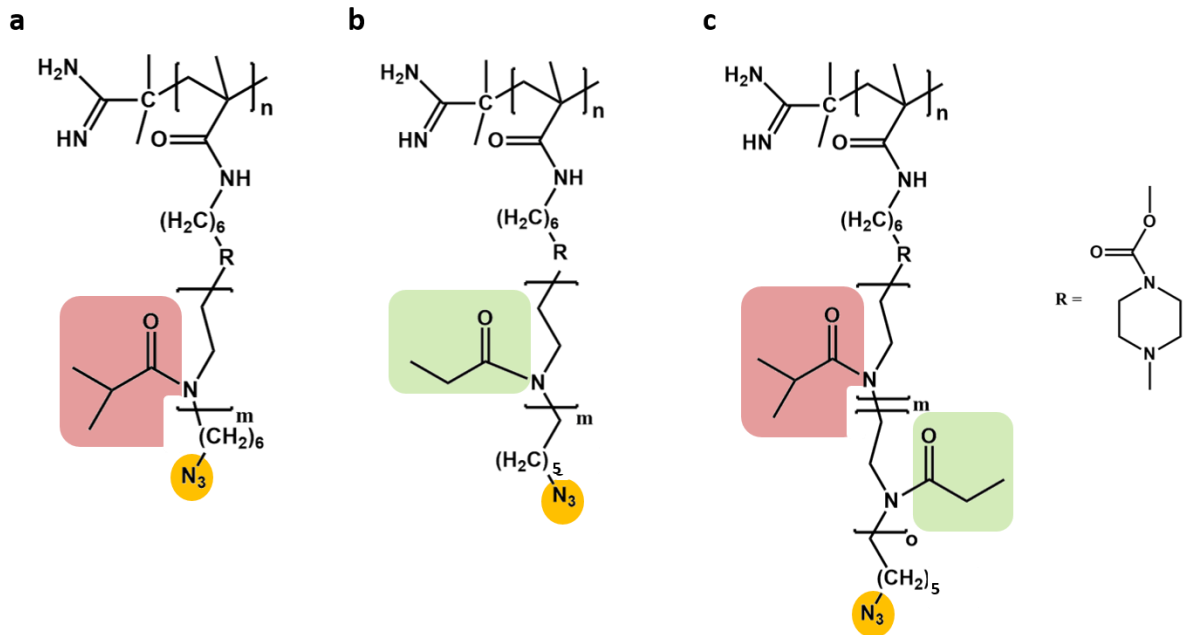
Poly(2-oxazoline) (POx) zählen zur Klasse der Pseudopeptide und lassen sich mittels kationischer lebender ringöffnender Polymerisation (LCROP) herstellen.<sup>[103]</sup> Weiterhin lassen sich die Architektur und Lösungseigenschaften sowie die Funktionalitäten dieser Polymere stark variieren.

Aufgrund ihres thermoresponsiven Verhaltens und ihrer Biokompatibilität werden POx als polymere Trägersysteme für biomedizinische Anwendungen diskutiert.<sup>[104-108]</sup>

Die Biokompatibilität steht im direkten Zusammenhang mit der Wechselwirkung zwischen einer Substanz und verschiedenen biologischen Einheiten. Mehrere Forschungsgruppen haben die Wechselwirkung von POx mit Proteinen untersucht. Es wird gezeigt, dass die meisten hydrophilen POx-Polymere lediglich eine geringe bzw. keine Interaktion mit Proteinen eingehen. Im Gegensatz dazu wird mit zunehmender Hydrophobizität eine erhöhte Tendenz zur Proteinadsorption und damit verbunden zur Zelladhäsion erhalten. Die geringe unspezifische Proteinadsorption zählt aber zu einer überaus wichtigen Eigenschaft im Zusammenhang mit der Blutzirkulation und der Polymerverteilung im Körper.<sup>[106, 109, 110]</sup>

Des Weiteren zeigt eine Reihe von verschiedenen POx-basierten Polymersystemen eine niedrige Zytotoxizität in unterschiedlichen Zelllinien.<sup>[111-113]</sup>

Die in dieser Arbeit verwendeten Poly(2-oxazoline) wurden von [REDACTED] im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert und weisen eine bürstenartige Struktur auf. Sie sind aus einem Methylacrylamid-Rückgrat und Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin) Seitenketten aufgebaut.<sup>[114]</sup>



**Abbildung 3-10: Strukturformeln der verschiedenen Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten**

Diese zylindrischen Polymerbürsten erlangen aufgrund ihres anisotropen Charakters im Vergleich zu ihren linearen Strukturanaloga immer mehr an Bedeutung. Discher et al. zeigen, dass die Blutzirkulationszeiten wurmartiger Mizellen gegenüber sphärischen Mizellen deutlich erhöht sind. Es werden Blutzirkulationszeiten von bis zu einer Woche erhalten.<sup>[115]</sup> Champion und seine Mitarbeiter beschreiben, dass anisotrope Strukturen im Vergleich zu sphärischen Partikeln eine geringere Erkennung durch Makrophagen zeigen.<sup>[116]</sup>

Ein weiterer Vorteil ist die Vielzahl an terminalen funktionellen Gruppen. Diese sind aufgrund der hohen Propfdichten und der damit verbundenen Abstoßung der benachbarten Seitenketten sehr leicht zugänglich und können zur Konjugation von biologisch aktiven Komponenten genutzt werden.<sup>[117]</sup>



## 4 Charakterisierungsmethoden

### 4.1 UV-VIS Spektroskopie<sup>[118]</sup>

Besitzt ein Molekül die Fähigkeit elektromagnetische Strahlung im Bereich des UV-VIS Lichts (200 nm - 740 nm) zu absorbieren, erfolgt die Anregung seiner Valenzelektronen. Das Licht regt die Valenzelektronen von ihrem besetzten Orbital niedriger Energie in ein freies Orbital höherer Energie an. Die Abschwächung der Intensität des eingestrahnten Lichts (Absorption  $A$  durch ein isotropes, homogenes Medium) ist nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz proportional zur Konzentration  $c$  der Probe und der Schichtdicke  $d$  der Küvette.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * d \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Hierbei sind  $I_0$  und  $I$  die Intensität der Strahlung vor und nach dem Durchgang durch die Probe.  $\varepsilon$  beschreibt den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten und ist eine stoffspezifische Konstante. Wird schließlich nach einer Messung die Absorption  $A(\lambda)$  gegen  $\lambda$  aufgetragen erhält man das Absorptionsspektrum der vermessenen Probe.

### 4.2 NMR Spektroskopie<sup>[118]</sup>

Bei der Kernspinresonanzspektroskopie („Nuclear Magnetic Resonance“, NMR) handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht die elektronische Umgebung einzelner Atome aufzulösen. Aufgrund der sich in einem statischen äußeren Magnetfeld befindlichen magnetischen Atomkerne wird ein Resonanzspektrum durch Absorption elektromagnetischer Strahlung verursacht. Voraussetzung für ein magnetisches Moment ist die Existenz eines Kerns mit einer ungeraden Anzahl an Protonen oder Neutronen (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , etc.). Ein Kern in einem statischen Magnetfeld besitzt aufgrund seines magnetischen Kernmoments mehrere Orientierungsmöglichkeiten. Diese werden mit Hilfe der magnetischen Kernspinquantenzahl  $I$  dargestellt.

Als Lösungsmittel werden bei der NMR-Spektroskopie deuterierte Lösungsmittel eingesetzt (z.B.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOD}$ , etc.). Während der Messung wird die Probe in ein statisches Magnetfeld  $H_0$  gebracht. Um die Probe befindet sich eine Induktionsspule, welche ein Wechselfeld der Frequenz  $\nu$  bewirkt. Die Feldstärke  $H_0$  wird schließlich solange verändert, bis

es zur Resonanz kommt. Im Resonanzfall wird ein Teil der Energie durch die Probe absorbiert. Diese Absorption ist durch eine Stromänderung messbar. Es wird das Kernresonanzspektrum erhalten.

### 4.3 Gelelektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen (z.B. Proteine) in einem elektrischen Feld.<sup>[119]</sup> Hierbei können Moleküle verschiedener Größe bzw. Ladung voneinander getrennt werden. Bei der Gelelektrophorese wird eine Spannung (elektrisches Feld) angelegt, wodurch die geladenen Moleküle durch das Gel wandern. Hierbei wirken zwei Kräfte auf die geladenen Partikel. Zum einem die Beschleunigungskraft:

$$F = qE \quad (\text{Gl. 4-2})$$

Mit  $q$  = effektive Ladung und  $E$  = elektrisches Feld. Dieser Kraft wirkt die Reibungskraft

$$F_f = fv \quad (\text{Gl. 4-3})$$

Mit dem Reibungskoeffizient  $f$  und der Geschwindigkeit  $v$  entgegen. Im Gleichgewicht gilt:

$$vf = qE \quad (\text{Gl. 4-4})$$

$$\text{bzw. } v = \frac{q}{f} \cdot E = \mu \cdot E \quad (\text{Gl. 4-5})$$

Mit  $\mu$  = elektrophoretische Mobilität

Bei der Gelelektrophorese wandern die geladenen Makromoleküle in einer Matrix. Dies sind für Proteine meistens Polyacrylamid-Gele. Hierbei bilden die Moleküle des Gels ein engmaschiges Netz, welches die Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert und somit die Makromoleküle nach ihrer Größe auftrennt.

Ein sehr häufiges Verfahren zur Auftrennung von Proteinen stellt die SDS-Gelelektrophorese dar. Dabei werden die Proteine durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate, SDS) denaturiert. Durch die Anlagerung der vielen negativ geladenen SDS-Moleküle um das Protein werden die Eigenladungen unterdrückt, sodass ein negativ geladener Komplex entsteht. Dadurch erfolgt die Auftrennung der Proteine nur noch über die Molekülgröße. Nach Beendigung der Elektrophorese werden durch Färben des Gels mittels einer „Coomassie-Blue“ Lösung oder des „SilverStains“ die Proteinbanden sichtbar gemacht. Mit

Hilfe eines Markers (Proteinmischung bekannter Molmasse) kann nun das Molekulargewicht bestimmt werden.<sup>[120]</sup>

#### 4.4 Lichtstreuung<sup>[121, 122]</sup>

Bei der Lichtstreuung handelt es sich um eine Absolutmethode zur Molmassen- und Radienbestimmung von Polymeren. Hierbei trifft ein Laserstrahl auf eine Probenlösung und erzeugt, falls das Molekül polarisierbar ist, in der Elektronenhülle einen Dipol. Dieser Dipol kann das Licht isotrop als elastische Strahlung emittieren und wird von einem Detektor winkelabhängig detektiert. In Abbildung 4-1 ist der Aufbau einer Lichtstreuanlage dargestellt.<sup>[123]</sup> In der Regel besteht diese aus einem Laser (Lichtquelle), verschiedenen Linsen und Lochblenden für die Fokussierung des Laserstrahls, einem Detektor oder mehreren Detektoren, welche auf einem beweglichen Goniometerarm angebracht sind, und einer Einheit zum Auswerten (Korrelator, Digital-Analog-Wandler, Computer). Da der Brechungsindex von Toluol dem der Glasküvette ähnelt und somit Reflexionen unterdrückt werden, wird die zu vermessende Lichtstreuaküvette in ein Toluolbad eingesetzt.

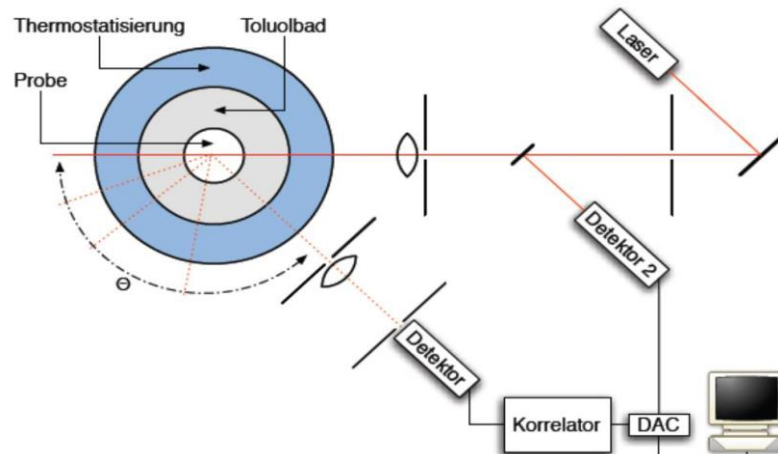


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung einer Lichtstreuanlage mit Streuwinkel  $\theta$ <sup>[123]</sup>

Es wird die statische Lichtstreuung (SLS) von der dynamischen Lichtstreuung (DLS) unterschieden.

##### 4.4.1 Statische Lichtstreuung (SLS)

Bei der statischen Lichtstreuung (SLS) wird die über einen längeren Zeitraum gemittelte Streuintensität bei verschiedenen Winkeln  $\theta$  gemessen. Aus der Zimm-Gleichung (Gl. 4-6)



lässt sich der in Abbildung 4-2 dargestellte Zimmplot ableiten. Aus diesem werden nach doppelter Extrapolation auf  $c = 0$  und  $q = 0$  folgende Informationen über die Struktur der Moleküle zugänglich: Das Gewichtsmittel  $M_w$ , der zweite Virialkoeffizient  $A_2$  und das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats  $\langle R_g^2 \rangle_z$ .

Zimm-Gleichung:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle_z q^2 \right) + 2A_2c \quad (\text{Gl. 4-6})$$

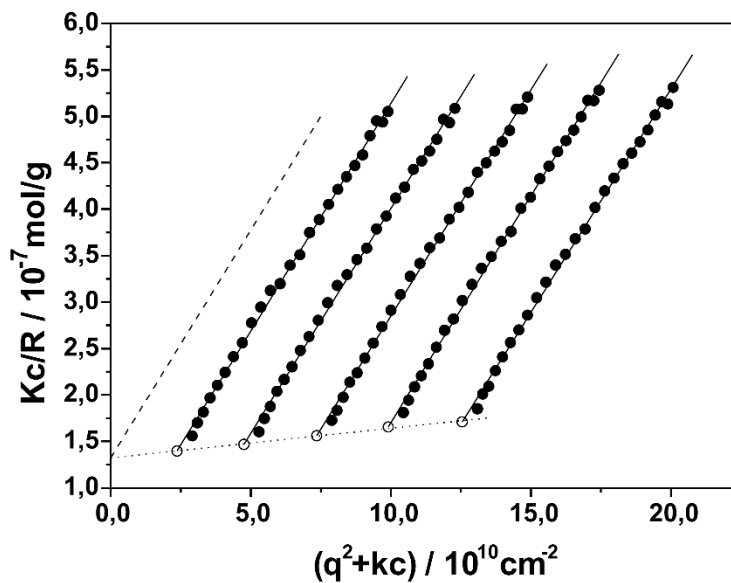


Abbildung 4-2: Exemplarischer Zimmplot<sup>[121]</sup>

Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Methode der DLS angewandt wurde, wird im Folgenden auf diese Methode genauer eingegangen.

#### 4.4.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

In der DLS wird die zeitliche Fluktuation der Streuintensität bei einem bestimmten Winkel untersucht. Diese Intensitätsfluktuation wird durch die Brown'sche Molekularbewegung verursacht. Bei gleicher Temperatur hängt die Geschwindigkeit der Diffusion lediglich von der Größe der in Lösung befindlichen Teilchen ab. Demnach werden für kleine Teilchen schnellere und für große Teilchen langsamere Brown'sche Molekularbewegungen erhalten. Die gemessenen Fluktuationen der Streuintensität werden nicht wie bei der SLS über einen Zeitraum gemittelt, sondern in eine Zeit-Intensitäts-Korrelationsfunktion umgeformt:

$$g_2(t) = \frac{\langle I(q,t) \cdot I(q,t+\tau) \rangle}{\langle I(q,t) \rangle^2} \quad (\text{Gl. 4-7})$$

In der Intensitätskorrelationsfunktion (Gl. 4-7) wird die Streuintensität  $I(q,t)$  zum Zeitpunkt  $t$  mit der Streuintensität  $I(q,t+\tau)$  zu einem Zeitpunkt um  $t=(t+\tau)$  multipliziert. Hierbei stellt  $\tau$  das kleinst mögliche Zeitintervall dar. Dieser Vorgang wird sehr oft für verschiedene Startzeiten wiederholt und anschließend über alle Werte gemittelt. Als Maximalwert der Autokorrelationsfunktion  $g_2(q, \tau)$  wird für  $\tau \rightarrow 0$  das Quadrat der Streuintensität  $\langle I^2 \rangle$  zum Startpunkt  $\tau_{obs}=0$  erhalten. Mit zunehmenden Korrelationszeiten  $\tau$  nimmt die Funktion exponentiell bis auf den Wert  $\langle I \rangle^2$  ab.

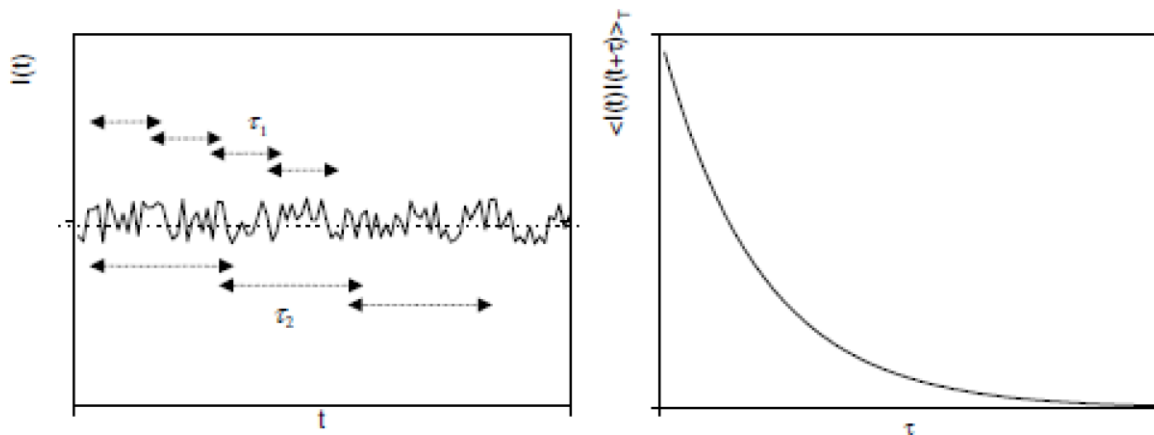


Abbildung 4-3: Fluktuierende Streuintensität und zugehörige Autokorrelationsfunktion<sup>[121]</sup>

Mit Hilfe der Siegert-Relation wird aus der Intensitätskorrelationsfunktion  $g_2(q, \tau)$  die Amplitudenkorrelationsfunktion  $g_1(q, \tau)$  erhalten.

$$g_1(q, \tau) = \sqrt{\frac{\langle I(q,t) \cdot I(q,t+\tau) \rangle}{\langle I(q,t) \rangle^2} - 1} = \sqrt{g_2 - 1} \quad (\text{Gl. 4-8})$$

Für kleine monodisperse Partikel folgt die Korrelationsfunktion  $g_1(q, \tau)$  einem einfach-exponentiellen Abfall:

$$g_1(q, \tau) = B \cdot \exp(-q^2 D \tau) \quad (\text{Gl. 4-9})$$

Mit  $B$  = Signal-Rausch-Verhältnis,  $q$  = Streuvektor und  $D$  = translatorischer Diffusionskoeffizienten

Im Fall von polydispersen Partikeln besteht die Korrelationsfunktion  $g_1(q, \tau)$  aus einer Superposition mehrerer solcher einfach abklingenden Exponentialfunktionen, welche mit  $P(D)$  gewichtet werden werden.

$$g_1(q, \tau) = \int_0^\infty P(D) \exp(-q^2 D_i \tau) dD \quad (\text{Gl. 4-10})$$

Neben dem Partikelformfaktor ist die Verteilungsfunktion  $P(D)$  auch von der Teilchenzahl sowie ihrer Masse abhängig.

Aus der Anfangssteigung der Korrelationsfunktion lässt sich der Diffusionskoeffizient für einen Winkel ermitteln. Aufgrund der Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Formfaktor besteht auch für diesen eine winkelabhängigkeit. Somit ist der ermittelte Diffusionskoeffizient  $D$  lediglich ein apparenter Diffusionskoeffizient,  $D_{app}$ :

$$D_{app} = \frac{\sum n_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (\text{Gl. 4-11})$$

Nach Extrapolation der apparenten Diffusionskoeffizienten gegen  $q = 0$  ( $P(q) = 1$ ) und  $c = 0$  wird das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten  $D_z$  erhalten.

$$D_{app}(q, c) = D_z (1 + C \langle R_g^2 \rangle_z q^2 + \dots) (1 + k_d c + \dots) \quad (\text{Gl. 4-12})$$

Mit  $C$  = dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig,

$$k_d = 2A_2 - k_f - v_p,$$

$A_2$ : 2. Virialkoeffizient

$k_f$  = Reibungskoeffizient

$v_p$ : partielles Molvolumen des Polymers

Über die Stokes-Einstein-Beziehung lässt sich aus dem Diffusionskoeffizienten  $D_z$  für die gelösten Partikel in der Probe das inverse z-Mittel des kugeläquivalenten, hydrodynamischen Radius  $R_h$  berechnen.

$$\frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} = \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} \quad (\text{Gl.4-13})$$

Mit  $k$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  =Temperatur,  $D$  = Diffusionskoeffizient und  $\eta$  = Viskosität des Lösungsmittels.

Das  $\rho$ -Verhältnis ist wie folgt definiert:

$$\rho = \sqrt{\left\langle R_g^2 \right\rangle_z \left\langle R_H^{-1} \right\rangle_z} = \frac{R_g}{R_H} \quad (\text{Gl. 4-14})$$

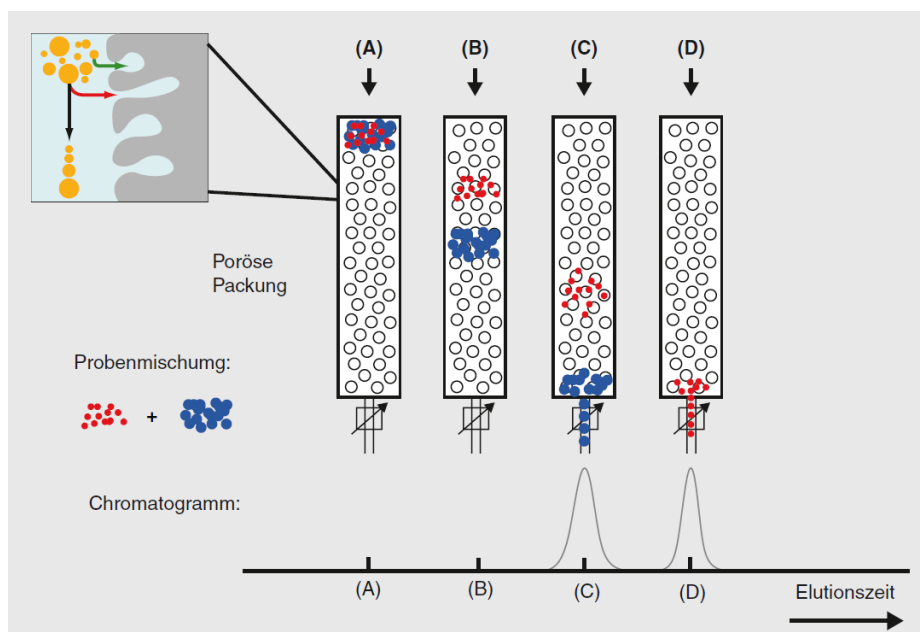
Mittels des Vergleiches des experimentell bestimmten  $\rho$ -Wertes aus statischer und dynamischer Lichtstreuung mit dem theoretisch berechneten Wert ist es möglich, Aussagen über die Geometrie der betrachteten Teilchen zu treffen.

**Tabelle 4-1:  $\rho$ -Verhältnis verschiedener Teilchengometrien<sup>[121]</sup>**

Teilchengometrie	Theoretisch berechnetes $\rho$ -Verhältnis
Homogene Kugel	0.775
Hohlkugel	1
Ellipsoid	0.775 - 4
Polymerknäuel	1.505
Zylinder der Länge $l$ und Durchmesser $D$	$\frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \ln\left(\frac{l}{D} - 0.5\right)$

## 4.5 Gelpermeationschromatographie (GPC)<sup>[124, 125]</sup>

Bei der Gelpermeationschromatographie handelt es sich um eine Relativmethode zur Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung von Makromolekülen. Zur Analyse wird die Probe auf eine Säule bestehend aus porösen Kügelchen aufgegeben (Abbildung 4-4). Als Säulenmaterial einer wässrigen GPC dient zum Beispiel vernetztes Dextran, Agarose oder Polyacrylamid. Die Substanzen werden aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens  $V_h$  getrennt. Der Trennmechanismus beruht auf der Zugänglichkeit der Poren des Gels. Demnach diffundieren Moleküle mit einem kleineren hydrodynamischen Radius während des Flusses in die Poren des Gels und verlassen somit später die Säule als Moleküle mit einem größeren hydrodynamischen Radius, die nicht in die Poren eindringen können. Zur Definition des oberen und unteren Ausschlussvolumens dient die Molekülgröße. Zu kleine Moleküle diffundieren in jede Pore wohingegen zu große Moleküle ungehindert die Säule passieren. Hierbei wird keine Auftrennung erzielt.



**Abbildung 4-4: Trennprinzip nach Molekülgröße<sup>[125]</sup>**

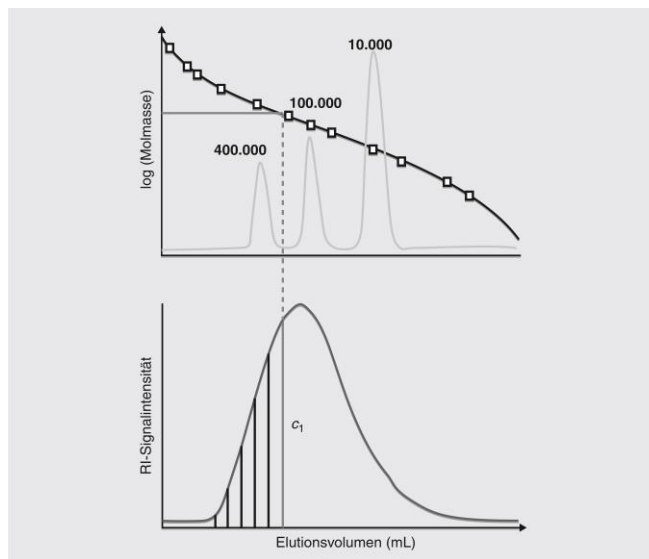
Zur Detektion dienen im Normalfall ein Brechungsindexdetektor und/oder ein UV-Detektor. Weitere mögliche Detektoren sind die Viskositäts-, Lichtstreuungs-, Infrarot- und Fluoreszenzdetektoren. Um eine exakte Beziehung zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen zu erlangen, muss für jedes Polymer eine Kalibrierung mit engverteilten Standardproben bekannter unterschiedlicher Molmasse durchgeführt werden. In Abbildung

4-5 ist ein Beispiel für solche eine Kalibrierung gezeigt. Experimentell wird folgender Zusammenhang gefunden:

$$\log M = a - b * V_e \quad (\text{Gl. 4-15})$$

Mit  $a, b$  = vom verwendeten Stoffsystem und Säulenmaterial abhängige Konstanten;  $M$  = Molekulargewicht und  $V_e$  = Elutionsvolumen.

Mit Hilfe dieser Kalibrierung kann jedem Elutionsvolumen eine Molmasse zugeschrieben werden.



**Abbildung 4-5: GPC-Kalibrierung mit eng verteilten Standardproben (oben); Ermittlung der Konzentrationsanteile  $c_i$  und entsprechenden Molmassen  $M_i$  einer breit verteilten Polystyrolprobe, RI-Brechungsindexdetektor<sup>[125]</sup>**

#### 4.6 Fluoreszenzspektroskopie<sup>[126]</sup>

Bei der Fluoreszenzspektroskopie werden Moleküle durch elektromagnetische Wellen des UV-VIS Bereichs auf ein höheres Energieniveau angehoben. Als Fluoreszenz wird die Abgabe der überschüssigen Energie des angeregten Moleküls in Form von elektrischer Strahlung des angeregten Moleküls bezeichnet. Das nach Absorption eines Photons angeregte Molekül gibt zwischen  $10^{-10}$  und  $10^{-7}$  Sekunden seine Strahlung ab. Als Resonanz-Fluoreszenz wird die Abgabe der Strahlung bei gleicher Wellenlänge bezeichnet. Bei langwelliger Abgabe spricht man von einer Stokes-Fluoreszenz und bei kurzwelliger (energiereicher) Abgabe von einer Antistokes-Fluoreszenz.<sup>[127]</sup> Während des angeregten Zustands kann das fluoreszierende Molekül mit seiner Umgebung in Wechselwirkung treten. In Abbildung 4-6 ist ein Jablonski-Diagramm dargestellt. Mit Hilfe von diesem werden die verschiedenen Mechanismen zur Desaktivierung gezeigt.

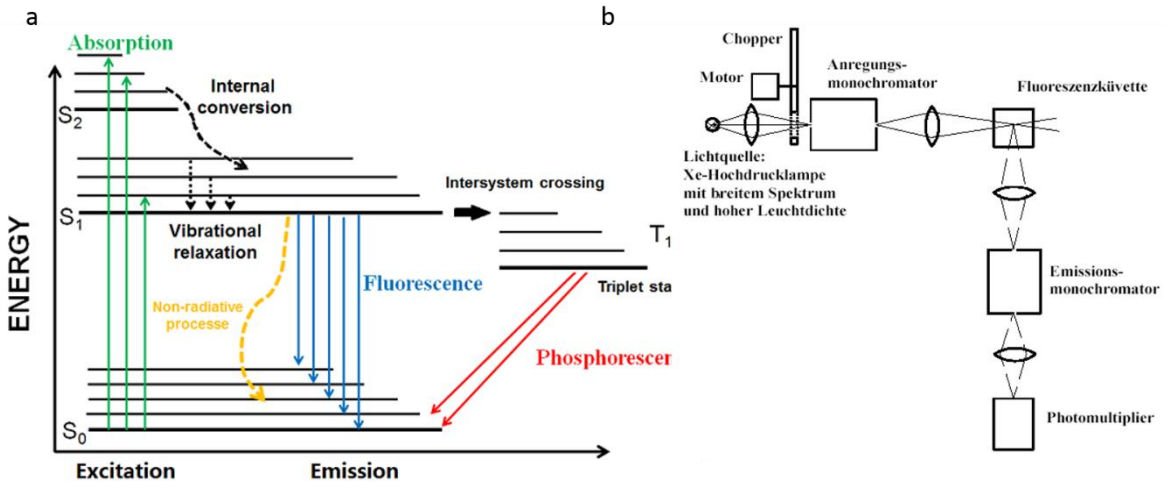


Abbildung 4-6: (a) Jablonski-Diagramm; (b) Messaufbau<sup>[126, 128]</sup>

Als Lichtquelle wird eine Lampe mit hoher Leuchtdichte (Xe-Hochdrucklampe) verwendet. Diese weist ein breites Spektrum auf und ist somit zur Anregung geeignet.

Das Licht wird mittels einer Linse auf den Anregungsmonochromator gelenkt. Dieser filtert nun eine bestimmte Wellenlänge bzw. einen bestimmten Wellenlängenbereich heraus. Die Fokussierung des daraus entstehenden Lichtstrahls auf die zu analysierende Probe erfolgt mit Hilfe einer weiteren Linse. Die emittierte Fluoreszenzintensität wird durch einen Detektor orthogonal zur Anregung erfasst. Das emittierte Licht wird mittels eines speziellen Filtersystems, meist einem zweiten Monochromator, von gestreutem Anregungslicht separiert.

Im Rahmen der Fluoreszenzspektroskopie können zwei Arten von Spektren aufgenommen werden (Abbildung 4-7).

Für die Aufnahme von Emissionsspektren wird die Wellenlänge  $\lambda_{\text{abs}}$  zur Anregung der zu untersuchenden Probe konstant gehalten und die Photonendichte  $\psi(\lambda)$  in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$  gemessen. Hingegen wird im Fall der Anregungsspektroskopie die Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{abs}}$  variiert und die Photonendichte  $\psi(\lambda)$  bei konstanter Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$  gemessen.<sup>[129]</sup>

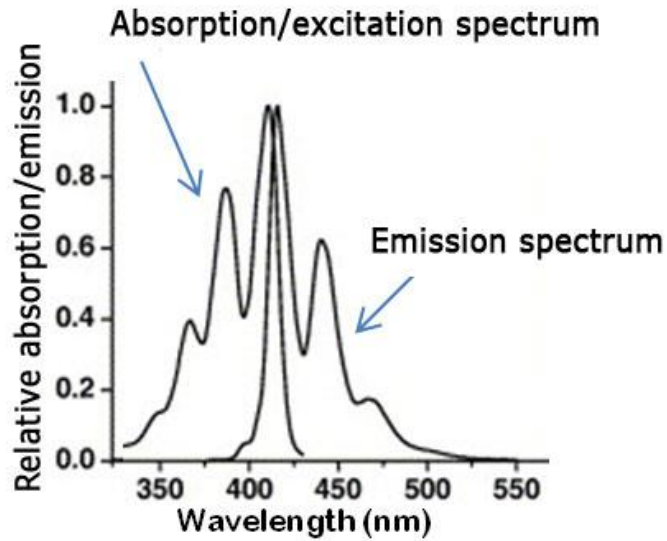


Abbildung 4-7: Anregungs- und Emissionsspektrum

#### 4.7 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)<sup>[130, 131]</sup>

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) erlaubt mittels eines konfokalen Mikroskops dynamische Eigenschaften (Diffusion) von gelösten Molekülen zu messen. Als Vorteile dieser Methode gelten die hohe Auflösung, sodass die Analyse einzelner Moleküle ermöglicht wird, außerdem die geringe Probenmenge sowie die kurze Messzeit von wenigen Sekunden.

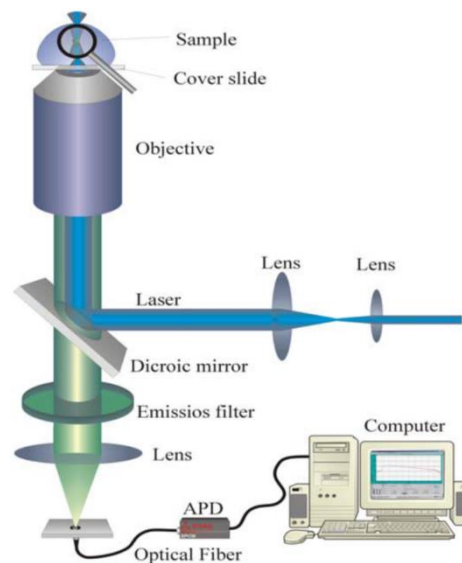


Abbildung 4-8: Schematischer Aufbau einer FCS-Apparatur<sup>[131]</sup>

Das Funktionsprinzip der FCS besteht darin, dass durch eine sehr gute Laserfokussierung in einer Lösung und des anschließenden Strahlengangs durch einen Pinhole ein sehr kleines



Probenvolumen aus der Lösung herausgegriffen wird. In Abhängigkeit von der Zeit werden Fluoreszenzphotonen gezählt und die Schwankungen der Fluoreszenzintensität untersucht. Diese Schwankungen werden durch Diffusion (Brownsche Bewegung) der fluoreszierenden Moleküle in und aus dem Detektionsvolumen verursacht. Somit können ähnlich wie bei der Lichtstreuung Diffusionskoeffizienten bestimmt werden.

Eine sehr wichtige Funktion zur Beschreibung eines Fluoreszenz-Korrelations-Experiment stellt die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  dar. Diese wird durch Multiplikation der Fluktuationen  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  bei einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  mit den Fluktuationen zu dem Zeitpunkt  $t + \tau$  und anschließender Normierung erhalten:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (\text{Gl. 4-16})$$

Die Beschreibung der Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu unterschiedlichen Zeiten,  $t$  und  $t + \tau$ , liefert Informationen über die Zeitskalen der involvierten dynamischen Prozesse.

Mittels der Poisson-Verteilung lässt sich die Eintrittswahrscheinlichkeit der Partikel in das konfokale Volumen beschreiben. Demzufolge können die Diffusionszeiten  $\tau_D$  aus der Intensitätskorrelationsfunktion ermittelt werden.

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left[ 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[ 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 4-17})$$

Mit  $\tau$  = Korrelationszeit,  $S$  = Achsenverhältnis des ellipsoiden Detektionsvolumen und der mittleren Zahl der Moleküle  $N = c \cdot V_{eff}$  im effektiven Volumen  $V_{eff}$ .

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0 \quad (\text{Gl. 4-18})$$

Die Diffusionszeit  $\tau_D$  (gemittelte Zeit, bei der sich die Moleküle im Beobachtungsvolumen befinden) ist vom Radius  $r_0$  und vom Diffusionskoeffizienten  $D$  abhängig.

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (\text{Gl. 4-19})$$

Die Stokes-Einstein Gleichung gibt die inverse Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten  $D$  und dem hydrodynamischen Radius  $R_h$  an.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (\text{Gl. 4-20})$$

Mit der Boltzmannkonstante  $k_B = 1.3806504 \cdot 10^{-23}$  J/K,  $T$  = absolute Temperatur,  $\eta$  = Viskosität und  $R_h$  = hydrodynamischer Radius des Moleküls.

Nach Kalibrierung des Beobachtungsvolumens ist es somit möglich den Diffusionskoeffizienten und dadurch über Stokes-Einstein den hydrodynamischen Radius fluoreszenzmarkierter Partikel zu bestimmen. Zur Kalibrierung werden im Normalfall Lösungen von Teilchen mit bekannten Diffusionskoeffizienten  $D$  verwendet.

#### **Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS)<sup>[131, 132]</sup>**

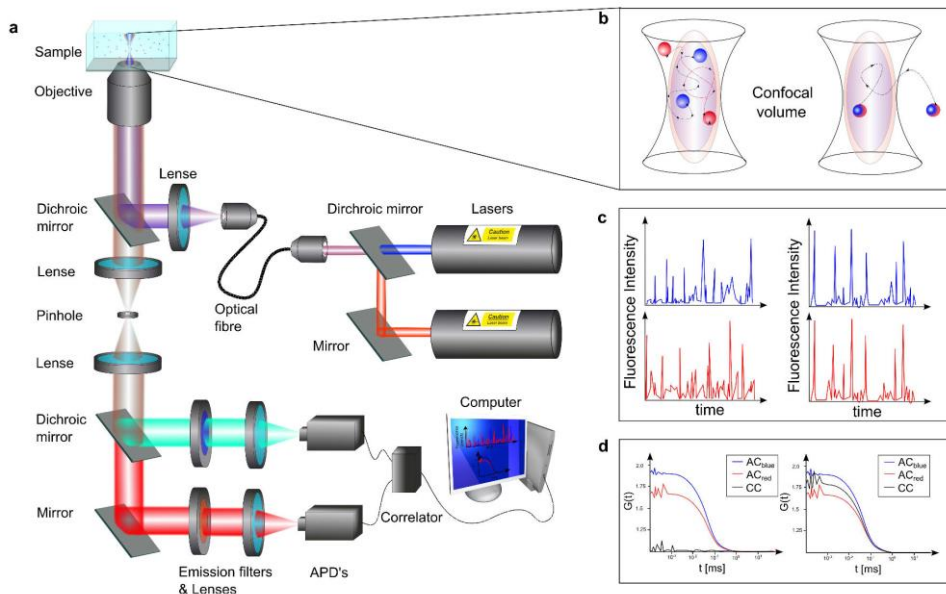
Die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) basiert auf der zuvor gezeigten Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Das Hauptprinzip beruht auf der Korrelation von zwei unabhängig erhaltenen Fluoreszenzintensitätsspuren, welche von zwei verschiedenen Detektoren aufgenommen werden.

In Abbildung 4-9 ist ein schematischer Aufbau sowie das Funktionsprinzip der FCCS dargestellt. Zwei Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen (blau und rot) werden gleichzeitig in einem Mikroskop gebündelt. Hierbei ist wichtig, dass sich beide Brennpunkte räumlich überlappen und ein „gemeinsames“ Beobachtungsvolumen bilden.

Die zu untersuchende Probe ist mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert, wobei der eine über den roten Laser und der andere durch den blauen Laser anregbar ist. Hierbei sollte ein „Cross-Talk“ vermieden werden, d.h. der rote Lasers darf den blauen Farbstoff nicht anregen und umgekehrt.

Nach Anregung beider Farbstoffe wird deren Fluoreszenz im gleichen Objektiv gesammelt. Im Anschluss wird das Fluoreszenzlicht nach Passierung eines „Pinholes“ und anschließender Separierung der blauen und roten Fluoreszenz mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels auf zwei unabhängige Detektoren unterschiedlicher Kanäle übertragen. Die Fluoreszenzintensitätssignale des blauen sowie des roten Kanals werden gleichzeitig aufgenommen und kreuzkorreliert. Unter idealen Bedingungen (kein „Cross-talk“) wird für einfarbig markierte

Moleküle eine Amplitude von  $G(0) = 0$  erhalten. Dagegen zeigt eine zweifarbig markierte Probe eine deutlich höhere Amplitude. (Abbildung 4-9-d).



**Abbildung 4-9:** (a) Schematischer Aufbau der FCCS; (b) räumlich überlappende Beobachtungsvolumen; (c) Fluoreszenzfluktuation; (d) Korrelationskurven<sup>[133]</sup>

#### 4.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)<sup>[134]</sup>

Die Entdeckung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops geht auf Marvin Minsky zurück und wurde im Jahre 1957 patentiert.<sup>[135]</sup> Mit dieser Art von Mikroskop kann das von einer Probe emittierte Licht aus der Fokusebene gesammelt werden.

In Abbildung 4-10 ist ein schematischer Aufbau eines des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops dargestellt. Mit Hilfe eines Objektivs erfolgt die Fokussierung des Laserlichtes auf einen Punkt in der zu analysierenden Ebene. Das nun ausgesendete Licht wird auf eine konfokale Lochblende (engl. „Pinhole“) fokussiert und von einem hinter dem Pinhole befindlichen Detektor gesammelt. Da lediglich das Fluoreszenzlicht aus dem Fokuspunkt bei Betrachtung einer Probe zum Detektor gelangt, können so optische Schnitte erhalten werden. Von der Probe emittiertes Streulicht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, wird von dem konfokalen Pinhole zurückgehalten und somit nicht detektiert.

Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop besitzt genau wie ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop einen strahlteilenden Spiegel (dichroitisch). Durch diesen wird anregendes Licht einer gewissen Wellenlänge mittels Reflexion zur Probe geführt sowie das

ausgesendete Licht des Präparats zum Detektor geleitet. Der Unterschied zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht nun darin, dass bei der LSM nicht das vollständige „Sichtfeld“ angeregt und aufgenommen wird, sondern rasterartig („Punkt für Punkt“ sowie „Linie für Linie“) stattfindet. Galvanometrische Scanspiegel werden dazu ausgenutzt das Laserlicht nacheinander durch die Probe zu führen. Dadurch kann ein kontrastreicher, hochaufgelöster optischer Schnitt erhalten werden. Wird nun die Fokusebene nach und nach in z-Richtung verschoben, können Stapel optischer Schnitte zusammengestellt werden, aus denen ein dreidimensionales Bild resultiert. Da mit Hilfe des CLSMs morphologische Details von Zellverbänden in Geweben, als auch auf subzellulärer Basis aufgrund seiner hohen Auflösung zugänglich sind, ist es somit möglich physiologische, pathologische Aspekte und die Aufnahme von Material in die Zellen zu untersuchen.

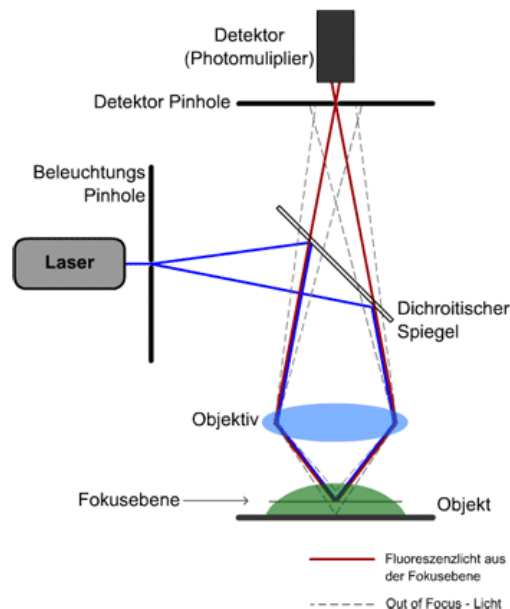


Abbildung 4-10: Schematische Darstellung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops<sup>[136]</sup>

#### 4.9 Durchflusszytometrie (FACS)<sup>[134, 137]</sup>

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS) ist die Klassifizierung und Trennung einzelner Zellen möglich. Parallel zur Zellgröße und Granularität kann ebenfalls die Fluoreszenzintensität pro Zelle ermittelt werden. Hierbei ist allerdings eine Markierung der Zellen zum Beispiel durch fluoreszierende Antikörper oder durch gebundene/aufgenommene fluoreszenzmarkierter Partikel/Polymere vorausgesetzt.

Dem FACS-Gerät werden vier generelle Funktionen zugeteilt.

- 1) Vibrationskammer: In dieser wird ausgehend von einer Zellsuspension eine Folge von feinsten Tröpfchen gebildet. Aufgrund der kleinen Tropfengröße kann höchstens eine Zelle pro Tropfen enthalten sein. Demzufolge liegen alle Zellen einzeln vor und sind somit der Einzelzellanalyse und Selektion zugänglich.
- 2) Messeinheit: Nach Kreuzung des Probenstroms mit einem Laserstrahl bei einem Winkel von  $90^\circ$  kommt es neben der Anregung von Fluorophoren zur Streuung des Laserstrahls (488 nm-blau) an Einzelzellen. Über die Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter, FSC) kann die Größe der Zelle und über die Seitwärtsstreuung (engl. side scatter, SSC) die Granularität einer Zelle bestimmt werden. Fluoreszenzmarkierte Antikörper dienen als Oberflächenmarker für Zellen. Durch diese ist sowohl die getrennte Untersuchung als auch die Isolierung von unterschiedlichen Zellpopulationen möglich.
- 3) Sammeleinheit: Nach der Messung wird der Zelle je nach Wert eine positive, eine negative oder keine Ladung zugeteilt. Demzufolge wird die Zelle nach Erhalt eines Impulses und Passierung der anschließenden Ablenkplatte in die korrespondierenden Sammelröhrchen geleitet.
- 4) Elektronischer Rechner: Dieser ist für die Steuerung des Gerätes sowie für die Aufbereitung der vielen Messwerte in ergreifbare Daten zuständig.

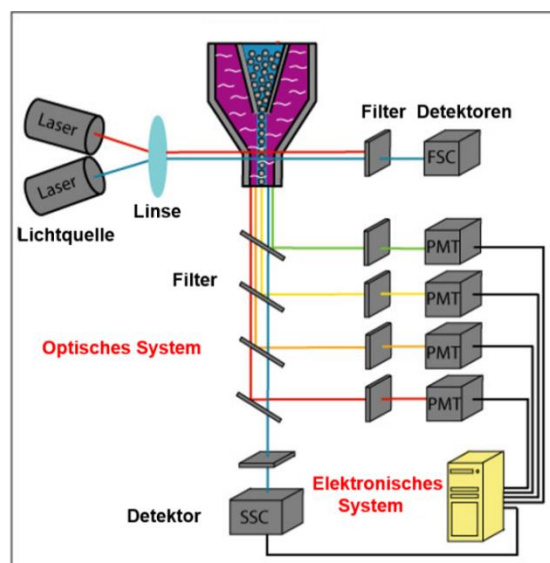
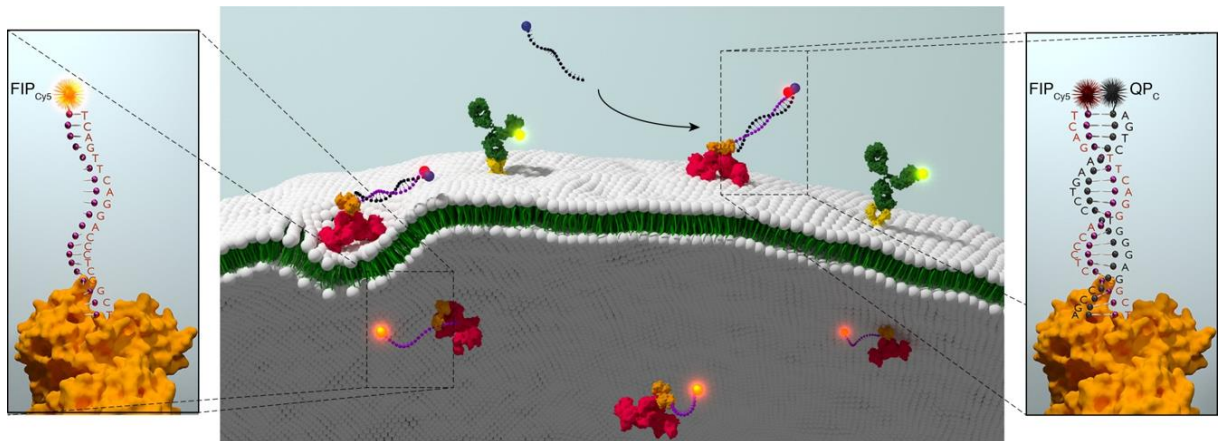


Abbildung 4-11: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers<sup>[138]</sup>

#### 4.10 „Specific Hybridization Internalization Probe“ (SHIP)<sup>[139]</sup>



**Abbildung 4-12: SHIP-Methode (engl. Specific Hybridization Internalization Probe)<sup>[139]</sup>**

Die von [REDACTED] und [REDACTED] („Monash University of Melbourne“) entwickelte SHIP-Methode („Specific Hybridization Internalization Probe“) stellt eine einfache Methode zur Untersuchung der Zellaufnahme von Materialien - beispielsweise Proteinen, Polymeren und Protein-Polymerkonjugaten - dar. Als vorteilhaft gegenüber anderen gängigen Methoden sind die Kompatibilität mit konventionellen Zellphänotypisierungen sowie die Unabhängigkeit von der Lokalisierung des Materials in der Zelle. Durch den Einsatz eines Sensors, welcher spezifisch die Fluoreszenz der auf der Zelloberfläche befindlichen Materialien auslöscht und nicht die der internalisierten Materialien, wird die Untersuchung der Internalisierungskinetiken von Nanopartikeln sowie Proteinen in lebende Zellen möglich. Der SHIP-Sensor besteht aus zwei 20-basigen ssDNA Sequenzen, wobei die Erste am 5` - Ende mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes (Cy5) markiert ist und am 3`-Ende eine zur Biokonjugation funktionelle Gruppe (-N<sub>3</sub>; -SH; - DBCO) trägt. Über diese kann das Material, welches auf Internalisierung untersucht werden soll, chemisch angebunden werden (engl. „Fluorescent Internalization Probe“ – FIPCy5). Die zweite Sequenz bildet ein zur ersten Sequenz komplementärer DNA-Strang, welcher am 3`-Ende mit einen „Black Hole Quencher 2“ (BHQ2) funktionalisiert ist. Diese kann demzufolge mit der ersten Sequenz (FIP) hybridisieren und wird erst zum Assay hinzugegeben, nachdem das zu untersuchende Material die Möglichkeit zur Internalisierung hatte. Die Zugabe des Quenchers zu den Zellen erfolgt bei 4 °C. Da bei 4 °C keine Internalisierung in die Zellen stattfindet, bindet der Quencher lediglich an die FIP-DNA auf der Zelloberfläche und löscht somit deren

Fluoreszenz, während die Fluoreszenz der internalisierten FIP-markierten Probe erhalten bleibt.

Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass aufgrund der Spezifität der DNA-Hybridsierung, alle anderen Fluorophore, wie zum Beispiel Oberflächenmarker zur Zelltypbestimmung, unberührt bleiben. Nach FACS-Analyse kann für bestimmte Inkubationszeiten die prozentuale Internalisierung, unter Einbeziehung von „Capping“, nach folgender Formel ermittelt werden.

$$\% - \text{Internalisation} = \frac{[I(\text{gequencht}, t=i) - I(\text{gequencht}, t=0)]}{[I(\text{ungequencht}, t=0) - I(\text{gequencht}, t=0)]} * 100 \quad (\text{Gl. 4-21})$$

„Capping“ tritt auf, wenn der Antikörper-Rezeptor Komplex bevor er in die Zelle aufgenommen wird von der Zelloberfläche abgestoßen wird und somit mit zunehmender Zeit die Fluoreszenz erlischt. Damit das von der Zelle internalisierte Material nicht überbewertet wird, muss „Capping“ mit in die Berechnung der prozentualen Internalisierung einbezogen werden (Gl. 4-21). Da zum Zeitpunkt  $t = 0$  noch kein „Capping“ auftritt wird also nicht auf das Fluoreszenzsignal der ungequenchten Probe bei einem bestimmten Zeitpunkt, sondern auf das Fluoreszenzsignal der ungequenchten Probe zum Zeitpunkt  $t = 0$  normalisiert. Im Vergleich dazu wird die totale Internalisierung wie folgt berechnet:

$$\text{totale} - \text{Internalisation} = \frac{[I(\text{gequencht}, t=i) - I(\text{gequencht}, t=0)]}{\text{Anzahl Fluorophore}} \quad (\text{Gl. 4-22})$$

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Untersuchung der Aggregation von kationisch geladenen Nanopartikeln in humanem Serum<sup>[140]</sup>

Für den stabilen Transport von siRNA werden definierte polymere Träger benötigt. Nanohydrogelpartikel haben demzufolge kürzlich an Attraktivität für einen solchen Transport gewonnen, da sie eine erhöhte Formstabilität gegenüber einfachen Polyplexen mit sich bringen.<sup>[141,142]</sup> Während im klassischen Polyplex mit kationischen Polymeren die negativ geladene siRNA als vernetzende Komponente im resultierenden Nanopartikel dient, liegen im Nanohydrogelpartikel bereits verknüpfte Netzwerke vor, in die sich die siRNA ladungsgetrieben einlagern kann ohne Einfluss auf die Nanopartikeltopologie. Für einen erfolgreichen klinischen Einsatz solcher Nanohydrogele ist die Untersuchung ihres Aggregationsverhaltens in humanem Serum unumgänglich: Die Oberfläche der Partikel kann durch Adsorption von Serumproteinen maßgeblich verändert werden, wodurch es zu unerwünschten Wechselwirkungen mit Zellen sowie einer ungünstigen Verteilung im Körper kommen kann.<sup>[114] [140]</sup>

An sich sollte für eine erfolgversprechende Anwendung dieser Träger die Ausbildung größerer Aggregate im Blutserum, die letztlich Blutgerinnung bis hin zu Thrombose induzieren können, vermieden werden.

Im Folgenden werden die von [REDACTED] synthetisierten kationisch geladenen Nanohydrogelpartikel<sup>[143]</sup> vor und nach Beladung mit siRNA mit Hilfe der von Rausch et al. entwickelten *pre in vivo* Untersuchungsmethode auf ihr Aggregationsverhalten in humanem Serum analysiert.<sup>[144]</sup>

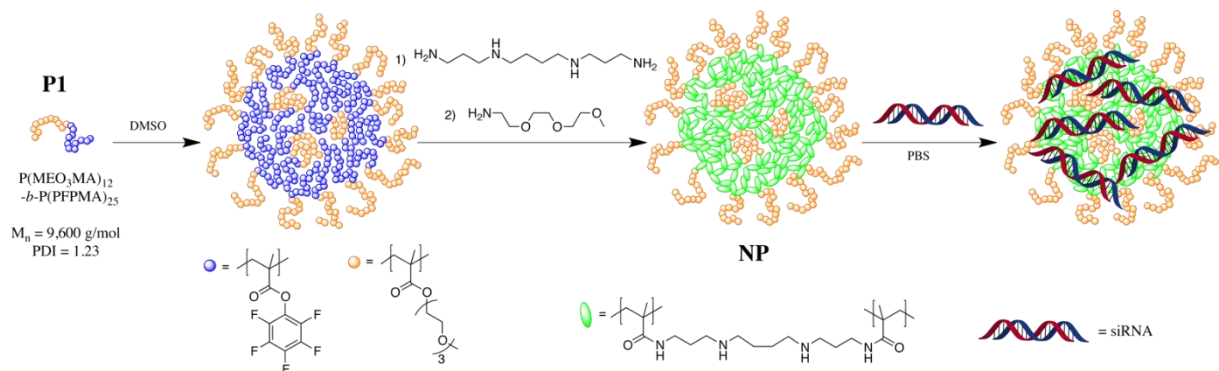


Abbildung 5-1: Reaktionsschema zur Synthese des Nanopartikels und Beladung mit siRNA<sup>[140]</sup>



Die Autokorrelationsfunktion (AKF) von humanem Serum kann durch eine triexponentielle Fitfunktion

$$g_{1,s}(t) = a_{1,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,s}}\right) + a_{2,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,s}}\right) + a_{3,s} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3,s}}\right) \quad (\text{Gl. 5-1})$$

mit den jeweiligen Amplituden  $a_i$  und Abklingzeiten  $\tau_i = (q^2 D_i)^{-1}$  beschrieben werden.

Die AKF der Nanopartikel (NP) alleine als auch nach Beladung mit siRNA werden perfekt mittels einer biexponentiellen Fitfunktion beschrieben.

$$g_{1,np}(t) = a_{1,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,np}}\right) + a_{2,np} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,np}}\right) \quad (\text{Gl. 5-2})$$

Aus dieser wird ein winkelabhängiger Diffusionskoeffizient  $D$  und somit nach dem Gesetz von Stokes-Einstein ein winkelabhängiger reziproker hydrodynamischer Radius  $R_h$  erhalten.<sup>[145]</sup> Nach Auftragung von  $1/R_h$  gegen  $q^2$  und anschließender Extrapolation gegen  $q^2 = 0$  wird der z-gemittelte hydrodynamische Radius  $R_h = \langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$  erhalten.

Kommt es zu keinen bzw. vernachlässigbaren aggregatbildenden Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und den Komponenten des Serums kann die AKF der Mischung perfekt mit Hilfe des Forcefits beschrieben werden. Der Forcefit wird aus der Summe der Korrelationsfunktionen jeder Individualkomponente, mit konstant gehaltenen Parametern  $a_i$  und  $\tau_i$  der zwei Komponenten (Serum/NP) und variablen Amplitudenanteilen  $f_s$  und  $f_{np}$ , erhalten.

$$g_1(t)_m = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) \quad (\text{Gl. 5-3})$$

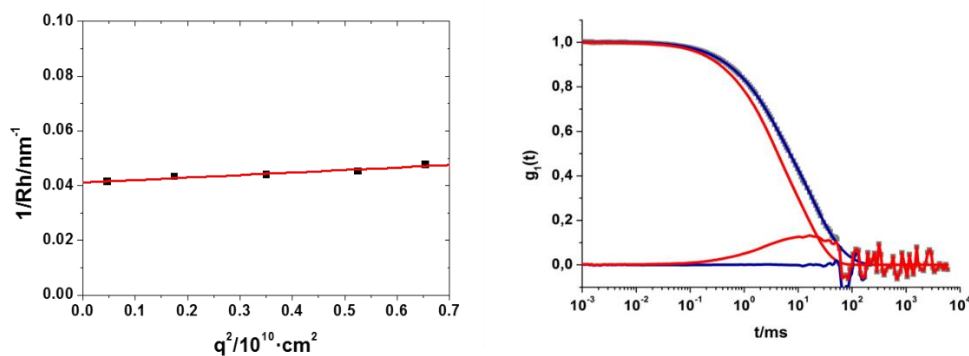
Im Fall einer Aggregation der Nanopartikel in humanem Serum und demzufolge einer Verbrückung der Partikel untereinander, kann der Forcefit  $g_1(t)_m$  die Autokorrelationsfunktion der Mischung nicht ausreichend gut beschreiben. Somit muss zur Gleichung  $g_1(t)_m$  eine weitere additive, Aggregat beschreibende Funktion zugefügt werden.

$$g_1(t)_{m+agg} = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) + f_{agg} g_{1,agg}(t) \quad (\text{Gl. 5-4})$$

Hierbei stellt  $f_{agg}$  den Amplitudenanteil der gebildeten Aggregate und  $g_{1,agg}$  die Autokorrelationsfunktion der gebildeten Aggregate dar.

$$g_{1,agg} = a_{1,agg} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,agg}}\right) \quad (\text{Gl. 5-5})$$

In vorangegangenen Arbeiten wurde von [REDACTED] die Aggregation unbeladener kationischer Nanohydrogelpartikel in humanem Serum untersucht. Nach biexponentiellem Fit wurden für die NP alleine in Puffer ein z-gemittelter hydrodynamischer Radius von  $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 26 \text{ nm}$  erhalten. Nach Inkubation mit humanem Serum jedoch wurde gezeigt, dass der Forcefit nicht ausreicht um die Autokorrelationsfunktion der Mischung zu beschreiben. Nach vollständiger Beschreibung der AKF wurden zusätzliche Aggregate von  $R_h = 300 \text{ nm}$  nachgewiesen (Abbildung 5-2).<sup>[10]</sup>



**Abbildung 5-2: Nanohydrogelpartikel NP (LN247): (a) Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius; (b) AKF in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Partikel; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Partikel und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel 30°; in 1X PBS; c = 0.05 g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ , T=293 K.**

### 5.1.1 Identifizierung der aggregatverursachenden Serumkomponenten

Um die Ursache der Aggregation aufzuklären, werden die unbeladenen kationischen Nanopartikel jeweils in den beiden Hauptkomponenten des Serums (HSA (bzw. hier BSA) und IgG) sowie in einer überwiegend anionischen Proteinlösung untersucht.

Für die beiden Komponenten, IgG und BSA, werden kommerziell erhältliche Proteinlösungen verwendet. Generell können diese auch durch Fraktionierung von Plasma mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie erhalten werden (siehe Kapitel 7.12). Eine vorwiegend anionische Proteinfraction wird wie in Abschnitt 7.12 beschrieben aus dem Plasma nach vorheriger Abtrennung von IgG und BSA aus dem Durchfluss der DEAE Säule gewonnen (Gelbilder siehe Anhang: Abbildung 8-1 und Abbildung 8-2).

Die Autokorrelationsfunktionen der Einzelproteinlösungen können jeweils mit Hilfe einer monoexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden.

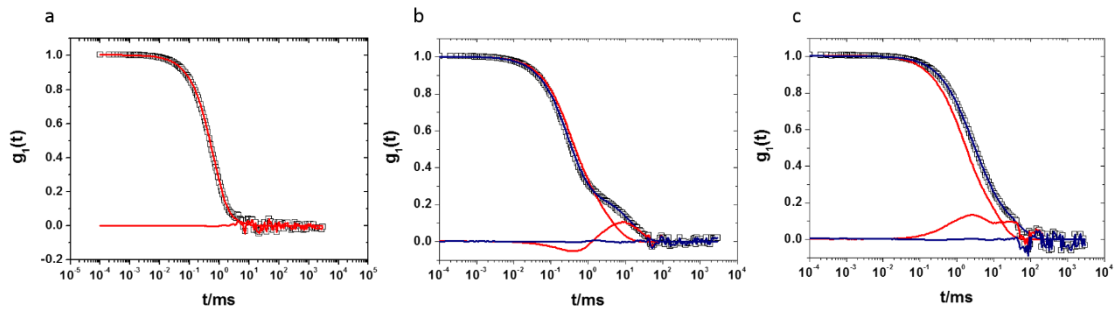
$$g_{1(t),prot} = a_{1,prot} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,prot}}\right) \quad (\text{Gl. 5-6})$$

Für BSA, IgG und die anionische Proteinfraction werden die z-gemittelten Radien  $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$  (BSA) = 3 nm,  $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ (IgG) = 6 nm und  $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ (anion.) = 16,6 nm erhalten (Anhang Abbildung 8-3).

Abbildung 5-3 zeigt die AKF der kationischen Nanopartikel in IgG, BSA und in anionischer Proteinlösung. In IgG-Lösung (a) können die Datenpunkte perfekt durch den Forcefit beschrieben werden und demzufolge kommt es zwischen den kationischen NP und IgG zu keiner mit dieser Messmethode bestimmbaren Wechselwirkung oder Aggregation.

In BSA-Lösung (b) hingegen lässt sich aus der Abweichung des Residuums erkennen, dass der Forcefit (roter Fit) alleine nicht ausreicht um die Datenpunkte exakt zu beschreiben. Für eine optimale Beschreibung der Daten muss eine zusätzliche aggregatbeschreibende Funktion eingeführt werden (blauer Fit). Es bilden sich Aggregate im Größenbereich von  $R_h = 150 \text{ nm} - 200 \text{ nm}$ . Unter Berücksichtigung des isoelektrischen Punkts von Albumin bei  $\text{pH} = 4,7^{[146]}$  und der Durchführung der Messungen in PBS ( $\text{pH} = 7,2$ ) liegt das Albumin partiell negativ geladen vor. Demzufolge kommt es zwischen den positiv geladenen Nanohydrogelpartikeln und den negativ geladenen Proteinen zu einer elektrostatischen Wechselwirkung, wodurch sehr wahrscheinlich die Aggregation hervorgerufen wird.

IgG hingegen besitzt einen isoelektrischen Punkt im neutralen pH-Bereich<sup>[146]</sup>, wodurch es kaum zu einer ladungsbasierten Wechselwirkung zwischen Partikel und Protein kommt und demzufolge keine Aggregate detektiert werden können. Um die Aussage der elektrostatischen Wechselwirkung zu stützen, werden die kationischen Partikel zusätzlich noch in einer vorwiegend anionischen Proteinlösung auf Aggregation untersucht. Auch hier wird eine zusätzliche aggregatbeschreibende Funktion benötigt. Erneut ergeben sich Aggregate im Größenbereich von  $R_h = 200 \text{ nm}$ , die auf die elektrostatisch getriebene Interaktion zwischen den kationischen Partikeln und den nun überwiegend anionisch geladenen Proteinen zurückzuführen ist.



**Abbildung 5-3:** ○ AKF der Nanohydrogelpartikel NP (LN247) in (a) IgG-Lösung, (b) BSA-Lösung und (c) anionischer Proteinfraction des humanen Serums; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus entsprechender Proteinlösung und Partikel; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus entsprechender Proteinlösung, Partikel und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel 30°; c = 0.05 g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8$  nm, T=293 K.

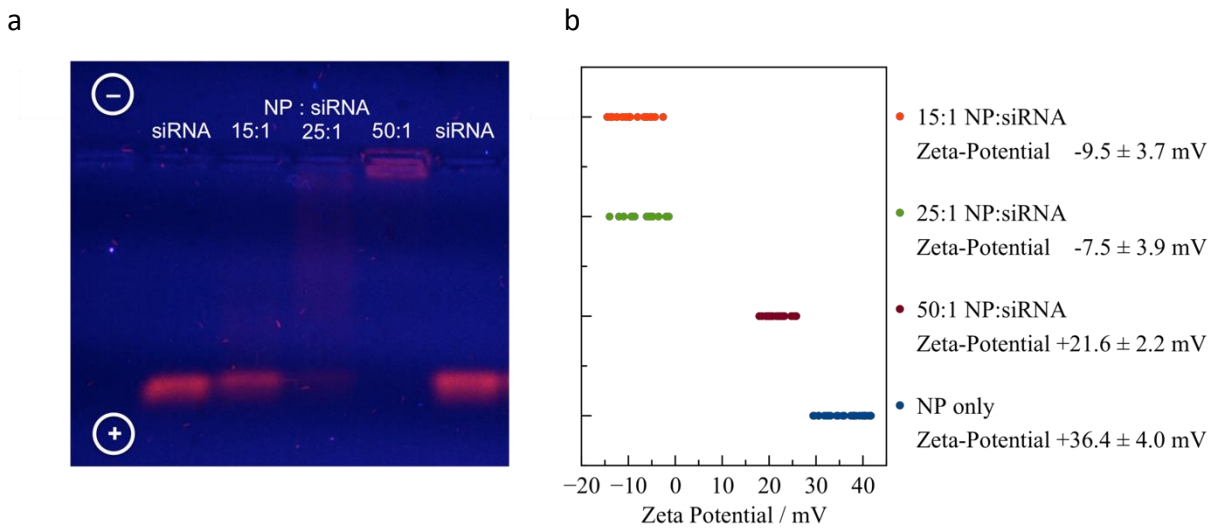
### 5.1.2 Beladung der kationischen Nanohydrogelpartikel mit siRNA

In einem weiteren Versuch werden die kationischen Nanohydrogele zu unterschiedlichen Graden mit siRNA beladen und auf Aggregation in humanem Serum untersucht. Die drei verschiedenen Gewichtsverhältnisse NP/siRNA (15:1, 25:1 und 50:1) werden von [REDACTED] eingestellt, indem zunächst zu den Hydrogelpartikeln unterschiedliche Mengen an siRNA gegeben werden. Nach Inkubation für 30 min kann durch elektrostatische Interaktion zwischen den kationischen Partikeln und der anionischen siRNA eine Beladung erfolgen.

Zur Prüfung werden ebenso von [REDACTED] Agarose-Gel-Experimente durchgeführt (Abbildung 5-4-a). Bei einem Verhältnis von NP/siRNA 15:1 ist erkennbar, dass ein großer Teil siRNA frei vorliegt und somit nicht vollständig vom Nanohydrogel komplexiert wird. Hingegen ist bei einem Verhältnis von NP/siRNA 50:1 keine freie siRNA zu sehen. Das gleiche gilt für die Partikel, welche mit einem Verhältnis von NP/siRNA 25:1 beladen werden, allerdings ist hier eine diffuse Bande zu sehen, die auf eine weitgehend abgesättigte Beladung der Partikel mit siRNA und daraus resultierende Ladungskompensation hindeutet.

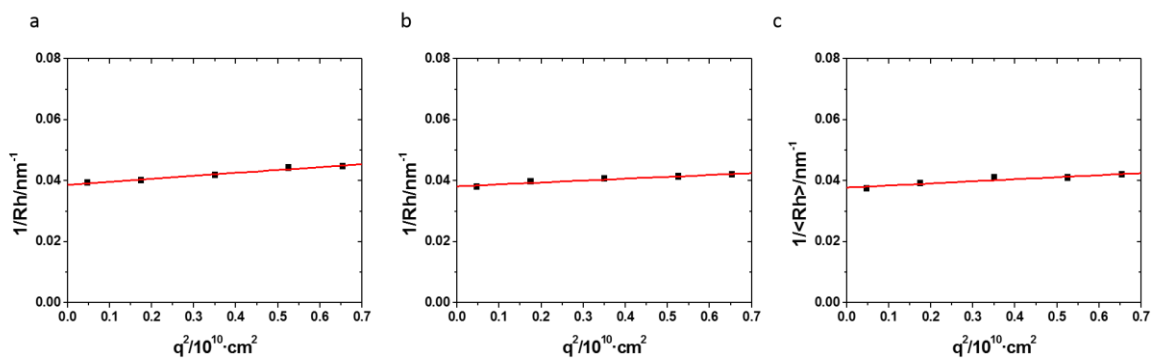
Diesbezüglich werden auch Zetapotential-Messungen durchgeführt (Abbildung 5-4-b). Die kationischen Nanopartikel alleine weisen ein Zetapotential von +36 mV auf. Dieser Wert ist auf die vernetzenden, positiven Spermeneinheiten im Inneren der Nanohydrogelpartikel zurückzuführen. Mit zunehmendem siRNA-Beladungsgrad nimmt aber das Zetapotential weiter ab. Die Partikel, bei denen keine freie siRNA vorliegt (NP:siRNA 50:1), aber noch nicht vollständig ladungskompensiert sind, besitzen ein Zetapotential von +20 mV. Dahingegen weisen die beiden anderen Beladungsgrade, bei vollständiger Beladung (25:1) oder sogar

Überladung (15:1, mit freier siRNA) ein leicht negatives Zetapotential auf (NP:siRNA 25:1; -7 mV und NP:siRNA 15:1; -9 mV). Im Folgenden wird die Beladung der NP mit siRNA mittels DLS untersucht.



**Abbildung 5-4: siRNA beladene Nanohydrogelpartikel (NP): Agarosegelelektrophorese (a) und Zetapotential-Messung (b).**

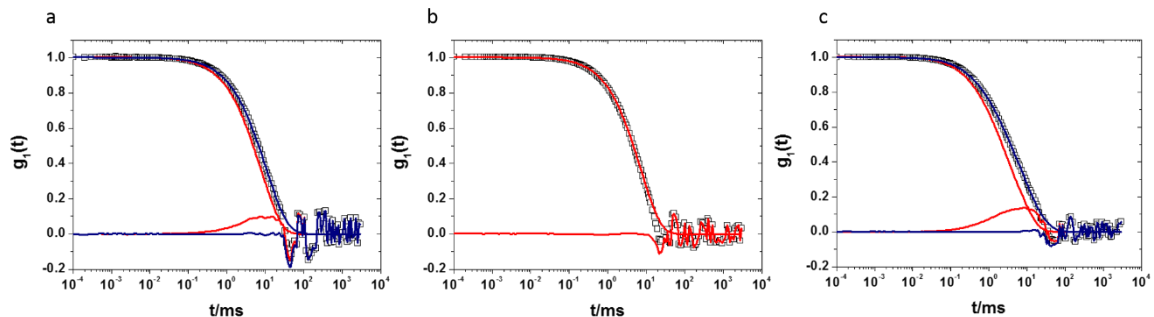
Unabhängig vom Beladungsgrad werden für die NP alleine sowie nach unterschiedlicher siRNA-Beladung ein hydrodynamischer Radius von  $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 26$  nm erhalten. Dies spricht für die Formstabilität dieser Oligonukleotidträger, die unabhängig von deren Beladungsgrad ist.<sup>[143, 147]</sup>



**Abbildung 5-5: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius: Nanohydrogelpartikel NP (LN247):siRNA; (a) 15:1; (b) 25:1; (c) 50:1.**

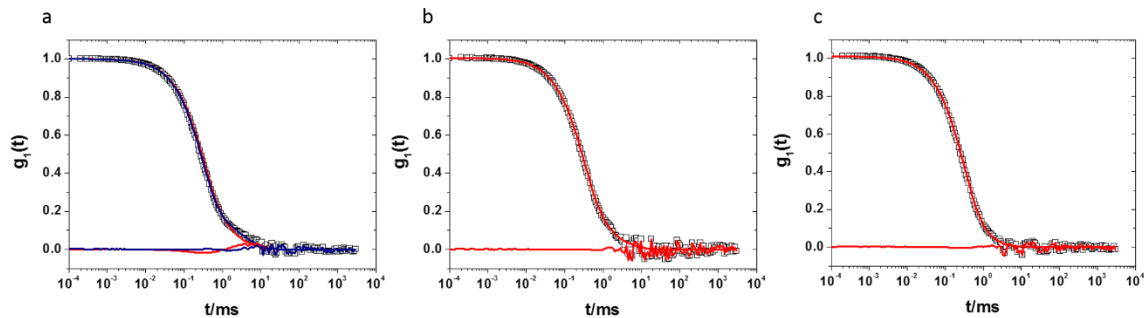
In Abbildung 5-6 sind die AKF der mit siRNA beladenen Nanohydrogelpartikel in humanem Serum dargestellt. Die mit einem Verhältnis von 50:1 beladenen Partikel (a) und gleichzeitig sehr positivem Zetapotential (+ 20 mV) zeigen eine vergleichbare Aggregation in humanem Serum wie die unbeladenen Nanohydrogelpartikel. Es werden Aggregate im Größenbereich von  $R_h = 220$  nm erhalten. Im Gegensatz hierzu können die Datenpunkte der Partikel mit

dem Verhältnis NP:siRNA 25:1 perfekt durch den Forcefit (b) beschrieben werden. Dies kann wieder anhand des neutralen bis leicht negativen Zetapotentials erklärt werden. Demzufolge sind die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und den im Serum vorhandenen Proteinen zu schwach um eine detektierbare Aggregation auszulösen.



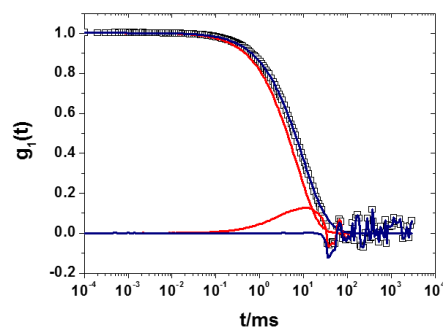
**Abbildung 5-6:** ○ AKF der siRNA beladenen Nanohydrogelpartikel NP (LN247) in Serum: (a) 50:1; (b) 25:1; (c) 15:1; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Partikel; - - - Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Partikel und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel 30°; c = 0.05 g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8$  nm, T=293 K.

Um die Aussage des ladungsinduzierten Aggregationsverhaltens zu stützen werden die siRNA-beladenen Partikel zusätzlich in einer BSA-Lösung vermessen, welche - wie bereits zuvor erwähnt - bei physiologischem pH = 7,2 vorwiegend negativ geladen vorliegt (Abbildung 5-7). In dieser Lösung zeigen lediglich die mit NP/siRNA 50:1 beladenen Partikel eine leichte Aggregation, wohingegen die beiden anderen (25:1 und 15:1) AKF perfekt mittels des Forcefits zu beschreiben sind. Somit würde man für die 15:1 beladenen Partikel in Folge des ebenso leicht negativen, nahezu neutralen, Zetapotentials (Abbildung 5-4-b) ein ähnliches Verhalten wie für die 25:1 beladenen Partikel in humanem Serum erwarten. Jedoch wird für die 15:1 beladenen Partikel im Serum eine aggregatbeschreibende Zusatzfunktion benötigt, um die Datenpunkte exakt zu fitten (Abbildung 5-6-c). Die Aggregation wird diesmal sehr wahrscheinlich durch die große Menge an freier siRNA im Serum verursacht (Vgl. Argarosegel Abbildung 5-4).



**Abbildung 5-7:**  $\circ$  AKF der siRNA beladenen Nanohydrogelpartikel NP (LN247) in BSA-Lösung ( $c = 80\text{g/L}$ ): (a) 50:1; (b) 25:1; (c) 15:1; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus BSA-Lösung und Partikel; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus BSA-Lösung, Partikel und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c = 0.05\text{ g/L}$ ; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8\text{ nm}$ ,  $T=293\text{ K}$ .

Deshalb wird in einem weiteren Experiment das Verhalten von freier siRNA in humanem Serum untersucht. Hierzu wird die freie siRNA mit der gleichen Konzentration, wie sie in den 15:1 beladenen Partikeln vorliegt, eingesetzt. Auch hier wird eine zusätzliche aggregatbeschreibende Funktion benötigt. Es bilden sich Aggregate im Größenbereich von  $R_h = 250\text{ nm}$ . Mit Hilfe eines Agarose Gelelektrophorese Experiments kann gezeigt werden, dass in dem Zeitraum der Serumsmessung (30 min) die siRNA noch nicht vollständig durch RNasen abgebaut ist (siehe anhang, Abbildung 8-4, Linie 4). Demnach kann diese beispielweise von bestimmten Immunproteinen des Serums erkannt werden und somit die Bildung größerer Immunkomplexe sowie Aggregate herbeiführen.



**Abbildung 5-8:**  $\circ$  AKF von siRNA in Serum --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und siRNA; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, siRNA und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c = 3.3\text{ }\mu\text{g/L}$ ; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8\text{ nm}$ ,  $T=293\text{ K}$ .

### 5.1.3 Zusammenfassung

Die von [REDACTED] synthetisierten kationischen Nanohydrogele wurden vor und nach Beladung mit siRNA in humanem Serum und in den Hauptserumkomponenten auf Aggregation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die stark kationischen Nanohydrogelpartikel (ohne siRNA) in Serum, Albumin und in der anionischen Proteinfraction aufgrund von Ladungseffekten Aggregate in der Größenordnung von  $R_h = 200 - 300$  nm induzieren. Nach siRNA Beladung zeigten die NP:siRNA 50:1 beladenen positiven Partikel aus den gleichen Gründen wie die unbeladenen Partikel Aggregation in Serum als auch in BSA. Die mit siRNA abgesättigten (und damit leicht neutralen bzw. leicht negativ geladenen) Partikel mit einem Verhältnis von NP:siRNA 25:1 führten zu keiner Aggregation in humanem Serum/BSA. Bei den ebenso leicht negativen, nahezu neutralen Partikeln mit einem Gewichtsverhältnis von NP:siRNA 15:1 wurde die Aggregation in humanem Serum durch den Überschuss an nicht komplexierter freier siRNA verursacht. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die kationischen Partikel sowie die siRNA alleine zur Aggregation in humanem Serum führen. Lediglich die Partikel mit einem nahezu neutralen Zetapotential und gleichzeitig vollständig komplexierter siRNA zeigten keine Aggregation in humanem Serum und stellen somit vielversprechende Kandidaten als stabile Träger zum sicheren Transport von siRNA dar. Diesbezüglich konnten von diesem System vor kurzem auch Erfolge in ersten *in vitro* Transfektionsexperimenten erhalten werden.<sup>[147]</sup>





## 5.2 Weitere polymere Trägersysteme für biomedizinische Anwendungen

Um als polymeres Trägersystem im menschlichen Körper Anwendung zu finden, wird dessen Biokompatibilität vorausgesetzt. Demzufolge ist eine Adsorption von Proteinen des humanen Serums, welche eine Aggregation verursachen, nicht erwünscht. Weiterhin sollen polymere Trägersysteme eine Größe zwischen 10 nm und 100 nm besitzen und keine unspezifische Zellaufnahme zeigen.<sup>[148]</sup>

Um den idealen Träger zu finden, werden in den folgenden Kapiteln verschiedene polymere Trägersysteme auf ihr Verhalten in humanem Serum sowie auf unspezifische Zellaufnahme untersucht.

### 5.2.1 Polymeranaloge Succinylierung von Poly-L-Lysin (PLL)

Aus früheren Arbeiten von [REDACTED] ist bekannt, dass PLL aufgrund sehr starker elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Polymer und den negativ geladenen Komponenten des humanen Serums aggregiert.<sup>[149]</sup>

Um diese Aggregation zu verhindern soll ein Teil der positiven Ladungen durch Succinylierung kompensiert werden. Hierbei werden die positiven Aminogruppen des PLLs zu negativ geladenen Carboxylatgruppen umgesetzt.

#### 5.2.1.1 Synthese

Basierend auf vorangegangenen Arbeiten [Diplomarbeit Sabine Gietzen, 2012] wird PLL (<sup>1</sup>H-NMR, siehe Abbildung 5-10) nach der Methode von Lindegren et al.<sup>[150]</sup> zu unterschiedlichen Graden succinyliert.

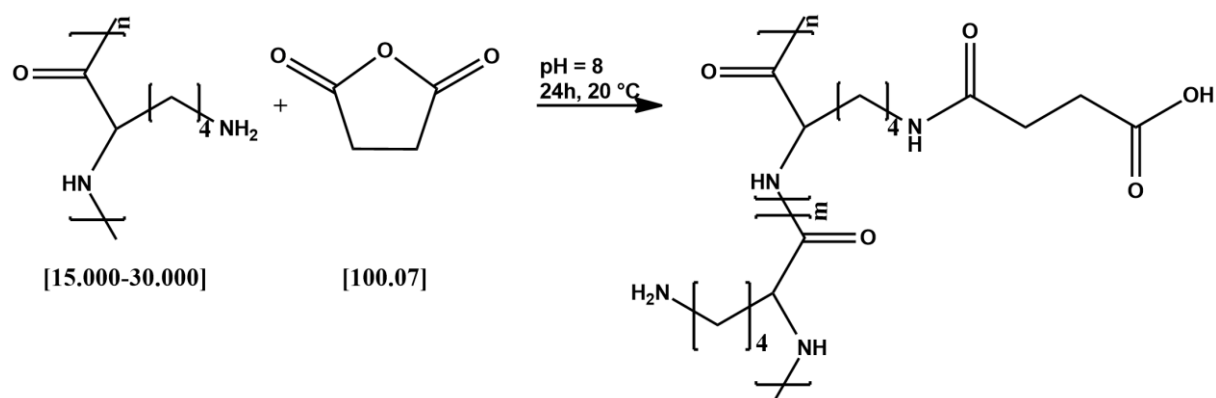


Abbildung 5-9: Succinylierung von PLL mittels Bernsteinsäureanhydrid<sup>[150]</sup>

Hierzu wird PLL wie in Abschnitt 7.5.1 beschrieben mit Bernsteinsäureanhydrid in Natriumbicarbonatpuffer bei pH = 8,5 und Raumtemperatur umgesetzt. Die Aufarbeitung erfolgt mittels Dialyse und Lyophilisation. Die Umsetzung zum succinylierten PLL wird mit Hilfe des in Kapitel 7.4 beschriebenen Assays zur Quantifizierung von primären Aminen (TNBSA-Assay) zweifelsfrei bestätigt. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum lässt sich anhand der Anzahl der Protonen und im  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum anhand der Anzahl der C-Atome die 37%, 49%, 60%, 80% und 100%ige Umsetzung bestätigen. Beispielhaft ist hierzu in Abbildung 5-11 das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 100%-succinylierten PLLs und in Abbildung 5-12 ist das  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum des 100%-succinylierten PLLs gezeigt.

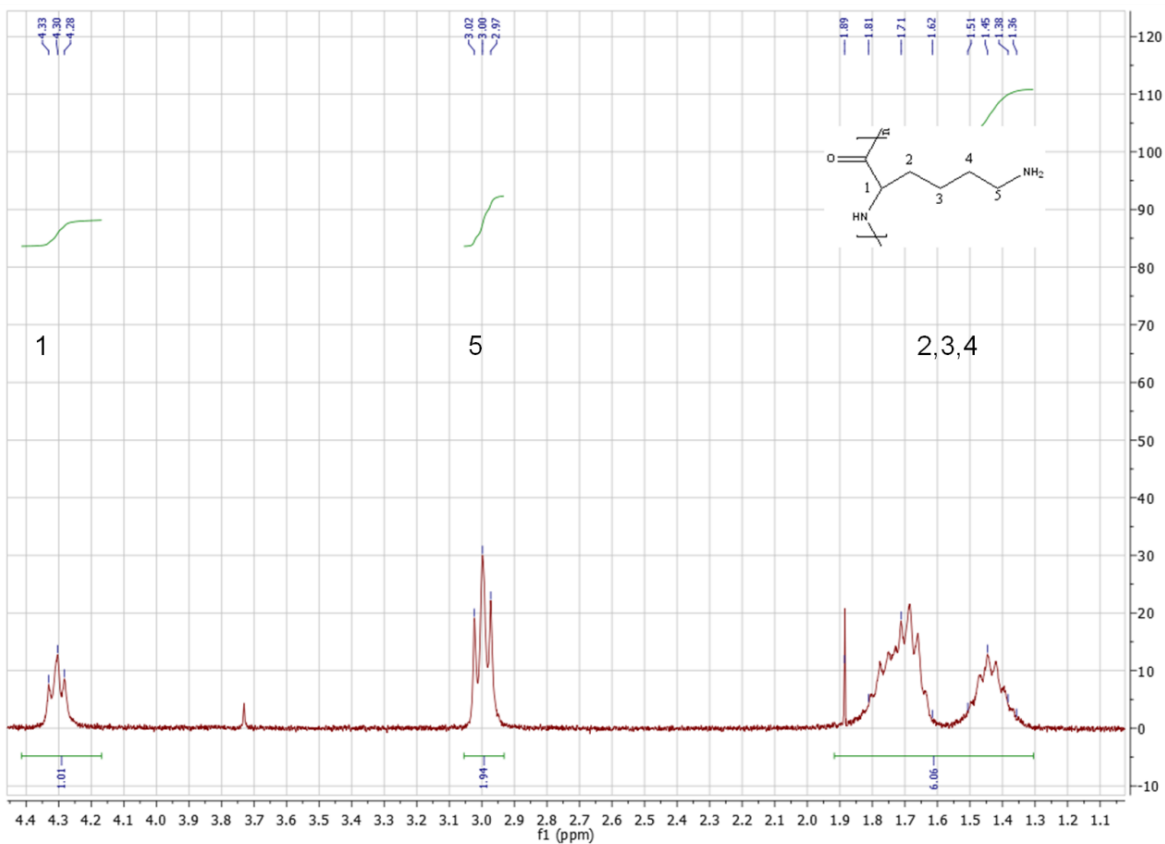


Abbildung 5-10:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PLL in  $\text{D}_2\text{O}$

## 5. Ergebnisse und Diskussion

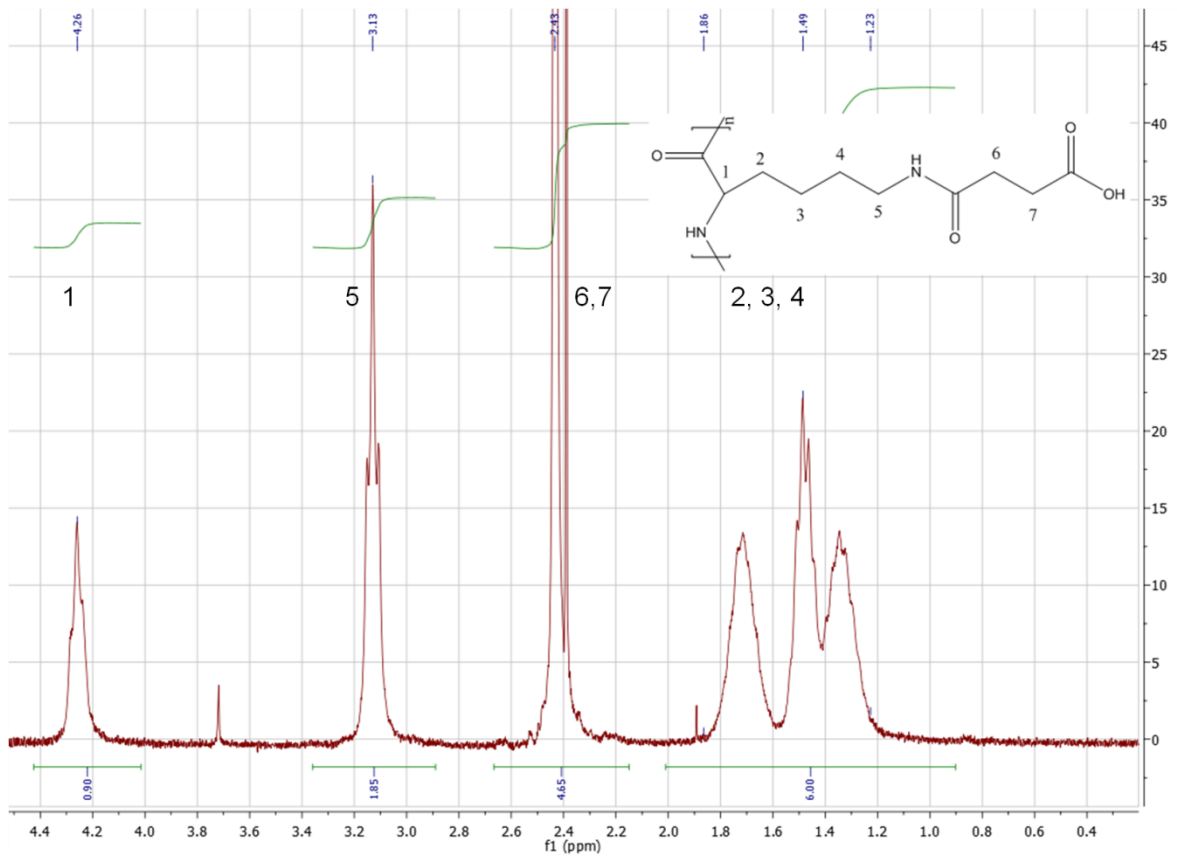


Abbildung 5-11: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 100%-succinyliertem PLL in D<sub>2</sub>O

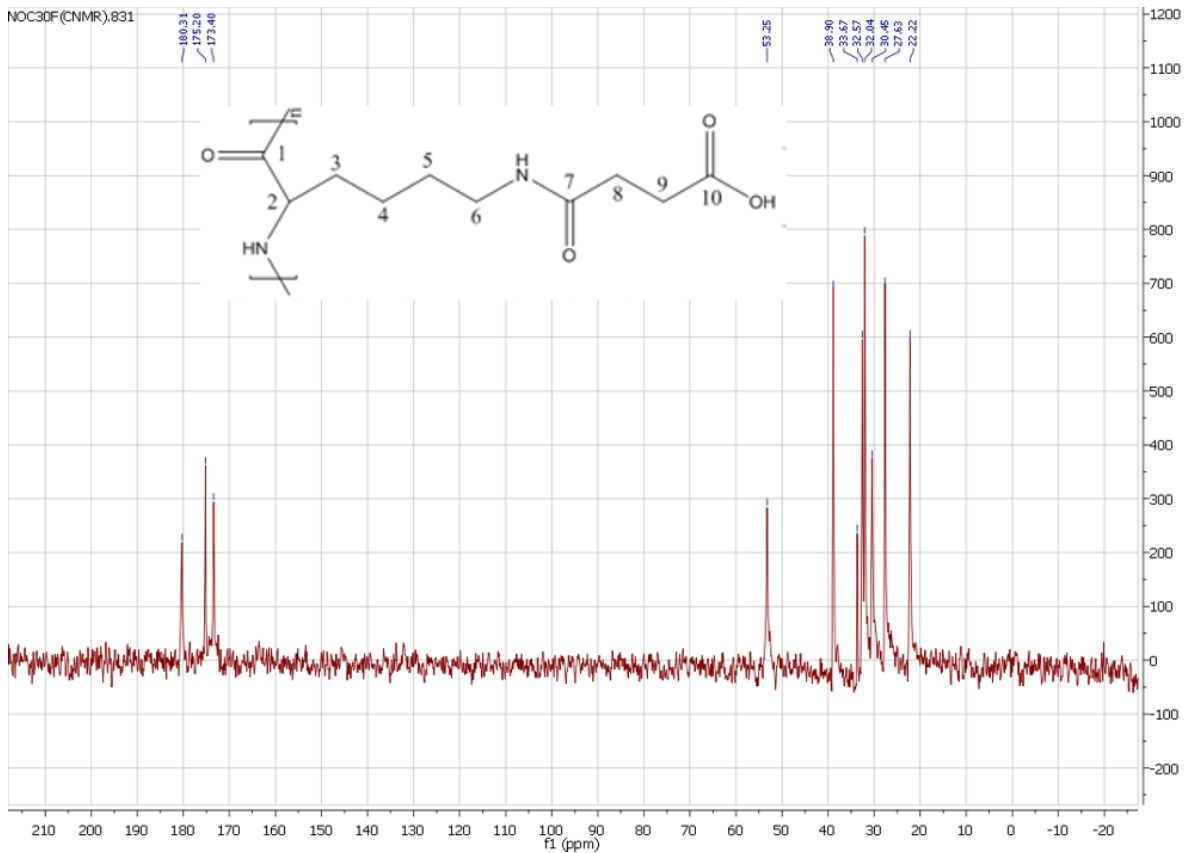


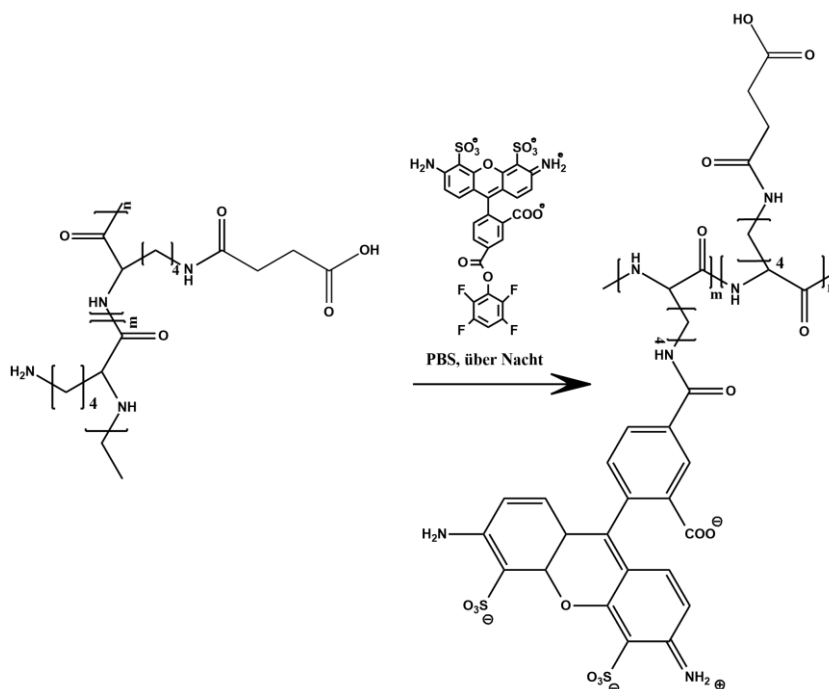
Abbildung 5-12: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von 100%-succinyliertem PLL in D<sub>2</sub>O

In Tabelle 5-1 sind die mittels DLS erhaltenen hydrodynamischen Radien der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Systeme gezeigt. Hierbei ist erkennbar, dass die Succinylierung kaum Einfluss auf diesen hat.

**Tabelle 5-1: Vergleich der hydrodynamischen Radien von PLL; 37%, 49%, 60%, 70% und 100% succinylierten PLL, in PBS-Puffer ( $c = 1\text{g/L}$ ),  $T = 293\text{ K}$ , biexponentieller Fit, Streuwinkel  $30^\circ$ .**

Probe	Rh( $30^\circ$ )/nm
PLL	2.5
37%-Succ-PLL	2.6
49%-Succ-PLL	2.4
60%-Succ-PLL	2.1
70%-Succ-PLL	2.1
100%-Succ-PLL	2.7

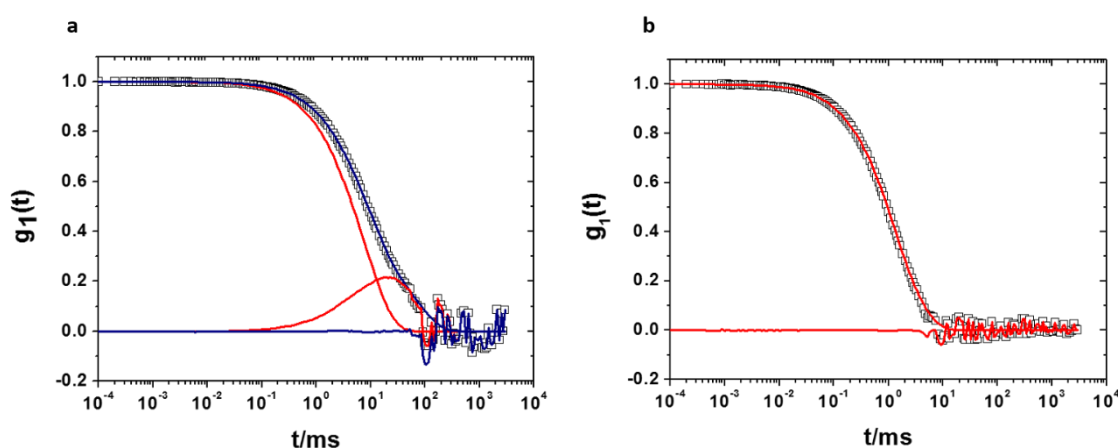
Für Zellaufnahmestudien werden die zu unterschiedlichen Graden succinylierten PLLs mit Ausnahme des 100%-succinylierten PLLs, da hier keine freien Amine zur weiteren Umsetzung mehr verfügbar sind, über die Aminogruppen mit dem Farbstoff AlexaFluor488 markiert (Abschnitt 7.5.3). Die Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs erfolgt mittels Bio-Rad P30 Gelfiltration. Die Anzahl der angebundenen Farbstoffe wird von Dr. Kaloian Koynov (MPIP-Mainz) mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie über das Verhältnis der Polymerphotocounts zu den Farbstoffphotocounts auf 1-2 Farbstoffmoleküle pro Polymerkette bestimmt.



**Abbildung 5-13: Farbstoffmarkierung des succinylierten PLLs mit AlexaFluor488**

### 5.2.1.2 Aggregationsverhalten in humanem Serum

Im folgenden Abschnitt werden die zuvor beschriebenen succinylierten PLLs bezüglich ihres Aggregationsverhalten in humanem Serum untersucht. In Abbildung 5-14 sind beispielhaft die AKF der Mischung aus Serum und 37%-succinylierten-PLL (a) sowie 49%-succinylierten PLL (b) abgebildet. Für das 37%-succinylierte PLL können die Datenpunkte nicht durch einen Multikomponentenfit bestehend aus Serums- und Polymeranteilen angefitet werden. Es wird eine weitere aggregatbeschreibende Funktion benötigt. Hingegen wird das zu 49% succinylierte Polymer nahezu perfekt durch den Forcefit (rot) beschrieben, sodass keine weitere Zusatzfunktion zur Beschreibung der Datenpunkte nötig ist.



**Abbildung 5-14:** ○ AKF von (a) 37%-Succ-PLL in Serum (b) 49%-Succ-PLL in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel 30°;  $c = 1 \text{ g/L}$ ; Filter: GHP 200 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T=293 \text{ K}$ .

In Tabelle 5-2 sind die hergestellten Succinylierungsgrade und die Größen der entstehenden Aggregate sowie deren Intensitätsbeiträge zur Gesamtintensität der Mischung aus Serum, Partikel und Aggregat aufgeführt. Es ist wie bereits im vorangegangenen Kapitel mit den kationischen Nanopartikel erkennbar, dass die Tendenz zur Aggregatbildung sehr von der Ladung des polymeren Trägers im Serum abhängt. Für das hier vorgestellte System lässt sich feststellen, dass die Aggregatgröße von der Ladungszahl abhängt. Somit werden mit höherer negativer Ladung kleinere Aggregate detektiert.

Für das nahezu neutrale 49%-succinylierte PLL (Abbildung 5-14-b) wird eine kaum detektierbare Amplitudenintensität von 8% erhalten und kann somit vernachlässigt werden. Mit zunehmenden Succinylierungsgrad (60% - 100%) und somit einem gleichzeitigen Ladungsanstieg (negative Ladung) wird ein erneuter Anstieg des Amplitudenanteils der

Aggregate beobachtet. Generell ist festzuhalten, dass sich das Ladungsverhältnis der Partikel auf das Aggregationsverhalten auswirkt. Kationische als auch anionische Partikel zeigen eine Tendenz zur Aggregation (im vorangegangenen Kapitel konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nicht nur polykationische Partikel alleine Aggregate induzieren, sondern auch übermäßig freie polyanionische siRNA). Hingegen scheinen zwitterionische Strukturen keine wirklich detektierbare Aggregation hervorzurufen.<sup>[10]</sup>

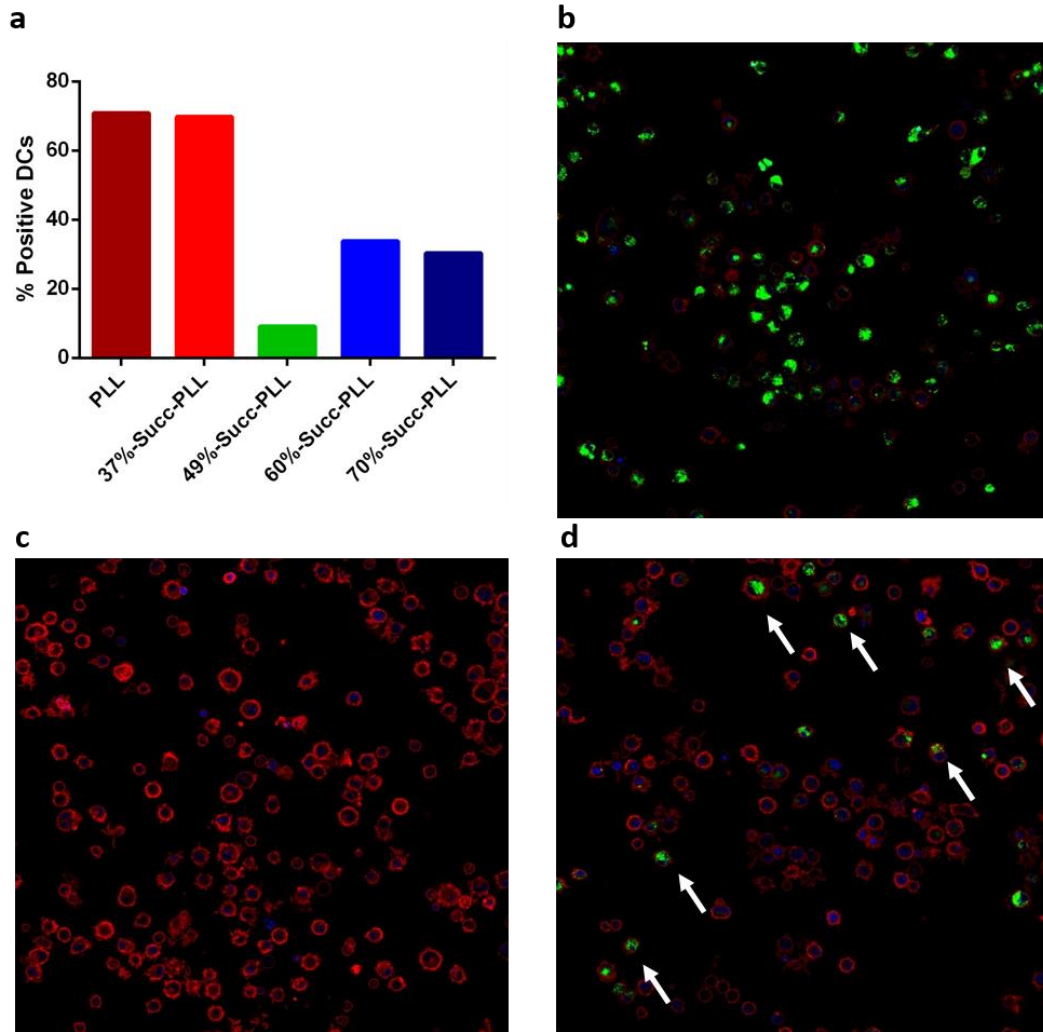
**Tabelle 5-2 Aggregation von PLL und Succinyliertem PLL (Succ-PLL) in humanem Serum,  $R_h$  des Serums, der verschiedenen Succinylierungsgrade und der entstehenden Aggregate; Beitrag von Aggregat, Polymer und Serumproteinmischung an der Gesamitintensität in %, Streuwinkel  $30^\circ$ .**

Probe	$R_{hSer}/nm$	I% $R_{hSer}$	$R_{hPLL}/nm$	I% $R_{hPLL}$	$R_{hAGG}/nm$	I% $R_{hAGG}$
PLL	34.7	0.46	2.5	0	595	0.54
37%-Succ-PLL	39.0	0.67	2.6	0	729	0.33
49%-Succ-PLL	<b>35.2</b>	<b>0.91</b>	<b>2.4</b>	<b>0.01</b>	<b>288</b>	<b>0.08</b>
60%-Succ-PLL	35.4	0.83	2.1	0.01	300	0.16
70%-Succ-PLL	35.4	0.76	2.1	0	298	0.24
100%-Succ-PLL	34.7	0.70	2.7	0	238	0.30

### 5.2.1.3 Zellaufnahmestudien

Die Zellaufnahme von AlexaFluor488 funktionalisierten succinylierten PLLs wird an dendritischen Knochenmarkzellen (BMDC) geprüft.

In Abbildung 5-15-a sind die Ergebnisse der FACS-Messungen zur Aufnahme nach 4 h bei  $37^\circ C$  für das PLL und die succinylierten PLLs gezeigt. Erwartungsgemäß wird das PLL und das 37%-succinylierte PLL zu 70% aufgrund der anziehenden Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Polymer und negativer Zelloberfläche unspezifisch von den BMDCs aufgenommen. Das 49%-succinylierte PLL zeigt in Folge seines nahezu neutralen Charakters lediglich eine unspezifische Aufnahme von 9%. Für das 60%-succinylierte PLL und das 70%-succinylierte PLL würde man aufgrund der negativen Nettoladung eine repulsive Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran vermuten. Jedoch wird eine unspezifische Zellaufnahme von 30% beobachtet. Dieses Verhalten kann durch eine mögliche Physisorption von positiven Proteinen des Zellmediums auf das negativ geladene Polymer erklärt werden. Der nun positiv geladene Komplex wird somit wieder aufgrund von attraktiven Wechselwirkungen von der Zelle aufgenommen.



**Abbildung 5-15: Aufnahme von PLL und Succ-PLL in BMDCs nach 4h; (a) FACS: ● PLL, 70.8 %; ● 37%-Succ-PLL, 69.8 %; ● 49%-Succ-PLL, 9.2 %; ● 60%-Succ-PLL, 33.8 %; ● 70%-Succ-PLL, 30.3 %; b)-d) CLSM Aufnahmen von PLL (b), 49%-Succ-PLL (c) und 70%-Succ-PLL (d) in BMDCs, 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; rot: Cell Mask Orange – Zellmembran; grün: Polymer (PLL, Succ-PLL).**

Ergänzend zu den FACS-Messungen sind in Abbildung 5-15-b-d die CLSM-Aufnahmen für PLL (b), 49%-succinyliertes PLL (c) und 70%-succinyliertes PLL (d) dargestellt. Für PLL (b) lässt sich sehr gut die unspezifische Zellaufnahme (grün) erkennen. Auch im CLSM-Bild des 70%-succinylierten PLLs (c) sind vereinzelt Polymere (grün) in den Zellen zu sehen. Hingegen ist bei der CLSM-Aufnahme des 49%-succinylierten PLLs keine unspezifische Aufnahme erkennbar. Demzufolge sind die Ergebnisse der FACS-Messungen bestätigt.



## 5.2.2 Succinylierte-Poly-L-Lysin-Bürsten (Succ-PLL-Bürste)

Im Vergleich zum linearen PLL wird bei den zylindrischen wurmartigen Polymerbürsten eine längere Blutzirkulationszeit und demzufolge eine bessere Bioverfügbarkeit vermutet.<sup>[115, 116]</sup>

Zudem werden die Polymerbürsten, welche eine anisotrope Form besitzen, im Vergleich zu sphärischen Partikeln schlechter von Makrophagen erkannt.<sup>[115, 116]</sup>

Ein weiterer Vorteil der Polymerbürsten ist die Möglichkeit zur hohen Funktionalisierung aufgrund der vielen verfügbaren Seitenketten. Demnach werden in den folgenden Abschnitten verschiedene Polymerbürsten als mögliche potentielle Trägersysteme für die Tumorimmuntherapie getestet.

Aufgrund der erfolgreichen Synthese des linearen succinylierten PLLs sowie der Verminderung bis hin zur Verhinderung der unspezifischen Zellaufnahme in BMDCs und der Aggregation in humanem Serum wird als erstes die Succinylierung der PLL-Bürste und deren Charakterisierung gezeigt.

### 5.2.2.1 Synthese

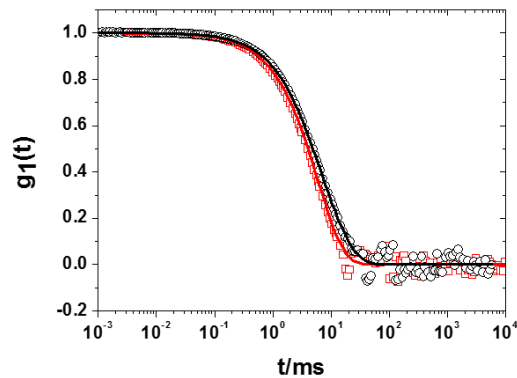
Die zur weiteren Umsetzung verwendete PLL-Bürste (Lys 55-3-2) wurde von Dr. Mike Sahl in der Gruppe von ██████████ synthetisiert. Die Eigenschaften der PLL-Bürste sind in folgender Tabelle zusammengefasst.<sup>[151]</sup>

**Tabelle 5-3: Lichtstreuergebnisse von Lys 55-3-2 in 0.5 N NaCl<sup>[151]</sup>**

Probe	Mw/ g/mol	Rg/nm	Rh/nm	$\rho(Rg/Rh)$
PLL-Bürste(Lys 55-3-2)	$\sim 8 \cdot 10^6$	60.4	44.8	1.35

Die Succinylierung der PLL-Bürste erfolgt analog zum linearen PLL (siehe Abschnitt 7.5.1). Es werden drei verschiedene Succinylierungsgrade (20%, 37% und 50%) eingestellt. Die Charakterisierung erfolgt mittels Elementaranalyse<sup>1</sup>, TNBSA-Assay und DLS. In Abbildung 5-16 sind beispielhaft die biexponentiellen Fitfunktionen der Autokorrelationsfunktionen der PLL-Bürste und der 50%-succinylierten PLL-Bürste gezeigt.

<sup>1</sup> Mikroanalytisches Labor ██████████, Remagen



**Abbildung 5-16: Experimentelle AKF und Fits: --- PLL-Bürste und --- 50 %-Succ-PLL-Bürste,  $c = 0.05$  g/L in 1X PBS, Streuwinkel  $30^\circ$ , Filter: GHP 450 nm,  $\lambda = 632.8$  nm,  $T=293$  K.**

Die Autokorrelationsfunktion der modifizierten PLL-Bürste ist leicht zu größeren Korrelationszeiten verschoben, das heißt, dass die Succinylierung Einfluss auf den hydrodynamischen Radius hat. Dies wird anhand der in Tabelle 5-4 dargestellten Werten für die hydrodynamischen Radien gezeigt. Für die PLL-Bürste wird bei einem Streuwinkel von  $30^\circ$  ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 51,7$  nm erhalten. Die hydrodynamischen Radien der succinylierten PLL-Bürsten betragen je nach Succinylierungsgrad ca. 57 nm – 62 nm und sind somit um ca. 10 -17% größer gegenüber der PLL-Bürste (Anhang Abbildung 8-10).

**Tabelle 5-4: Hydrodynamische Radien der PLL-Bürste sowie der zu unterschiedlichen Graden succinylierten PLL-Bürsten in 1X PBS (0.152 M NaCl)**

	PLL-Bürste	20%-Succ-PLL-B	37%-Succ-PLL-B	50%-Succ-PLL-B
$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$	51.7 nm	57.0 nm	62.0 nm	59.9 nm

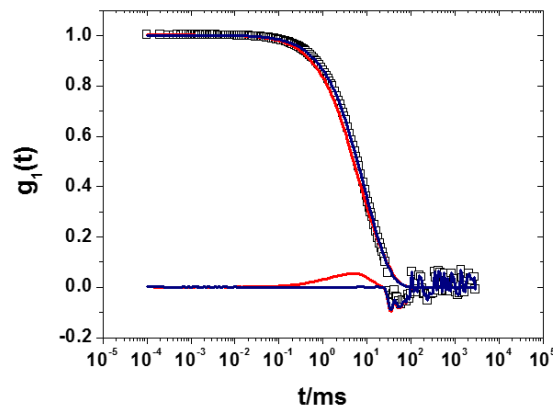
Die Farbstoffmarkierung mit AlexaFluor488 erfolgt ebenfalls, wie am Beispiel der linearen Polymere gezeigt, über die freien Amine und die Aufreinigung mittels Bio-Rad P30 Gelfiltration. Die Anzahl der gebundenen Farbstoffe pro Polymerkette wird auch hier über das Verhältnis der Polymerphotocounts zu Farbstoffphotocounts von [REDACTED] (MPIP-Mainz) mittels FCS bestimmt.

**Tabelle 5-5: Ergebnisse der FCS-Messungen**

	20%-Succ-PLL-B	37%-Succ-PLL-B	50%-Succ-PLL-B
Farbstoffe	30	80	60

### 5.2.2.2 Aggregation in humanem Serum

Die zu unterschiedlichen Graden succinylierten PLL-Bürsten zeigen alle Aggregation in humanem Serum. Es werden Aggregate im Größenbereich von  $R_h = 100 \text{ nm} - 200 \text{ nm}$  detektiert. In Abbildung 5-17 wird die Aggregation am Beispiel der 50%-succinylierten PLL-Bürste verdeutlicht. Zur Beschreibung der experimentellen Daten der Mischung aus Serum und Polymer ist eine aggregatbeschreibende Zusatzfunktion (blau) nötig, wie an der Abweichung des Residuums erkennbar ist (rot).



**Abbildung 5-17:** ○ AKF von 50%-Succ-PLL-Bürste in Serum --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $60^\circ$ ;  $c = 0.05 \text{ g/L}$ , Filter: GHP 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T=293 \text{ K}$ .

Die nun auftretende Aggregation der 50%-succinylierten PLL-Bürste in humanem Serum im Vergleich zum linearen PLL kann dadurch erklärt werden, dass im Fall der PLL-Bürste sehr wahrscheinlich nur die äußeren positiven Aminogruppen durch negative Carboxylatgruppen ersetzt werden. Somit besitzt das Polymer auf der Außenseite eine negative Nettoladung. Demnach kann es nicht mehr, wie im Fall des 50% succinylierten linearen PLLs, als Zwitterion angesehen werden. Demzufolge kommt es zur Aggregation zwischen dem „negativ“ geladenen Polymer und den positiv geladenen Serums Komponenten, welche jedoch im Vergleich zum reinen PLL deutlich geringer ausfällt und möglicherweise durch die Anbindung bioaktiver Komponenten vollständig unterdrückt werden kann. Demnach stellen diese Systeme potentielle Kandidaten für die Anwendung als „Nanocarrier“ in der Biomedizin dar.

### 5.2.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Als weitere mögliche polymere Trägersysteme gelten die von [REDACTED] synthetisierten Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten.<sup>[152]</sup>

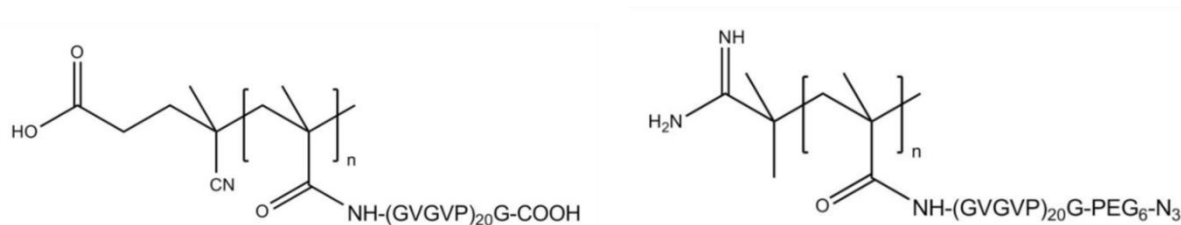


Abbildung 5-18: Strukturformeln der Poly(MA-ELP)-Bürsten: (a)-COOH und (b) -N<sub>3</sub>

Elastin-ähnliche Polypeptide lassen sich von dem natürlich vorkommenden Protein Tropoelastin ableiten. In Tabelle 5-6 sind die Eigenschaften der beiden Poly(MA-ELP)-Bürsten aufgeführt.

Tabelle 5-6: Lichtstreuerggebnisse von Poly(MA-ELP) in 2 mM NaCl<sup>[152]</sup>

Probe	Mw/ g/mol	Rg/nm	Rh/nm	Funktionelle Gruppe
Poly(MA-ELP)	4.9*10 <sup>6</sup>	51.7	35.2	-COOH
N <sub>3</sub> -Poly(MA-ELP)	1.8*10 <sup>6</sup>	33.3	23.5	-N <sub>3</sub>

#### 5.2.3.1 Aggregationsverhalten in humanem Serum

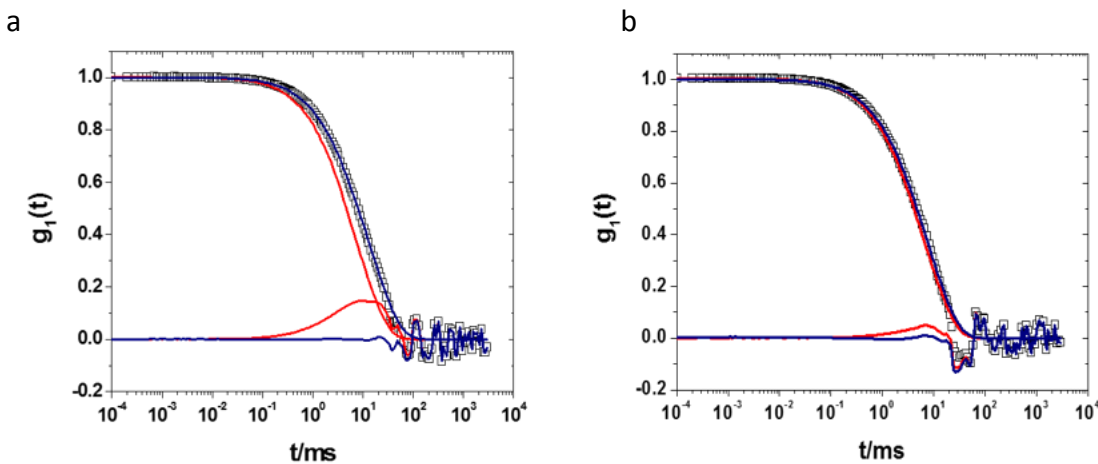
Da generell bei Polypeptidbürsten von einem „Stealth“-Effekt ausgegangen wird, sollten für diese Systeme keine unspezifischen Wechselwirkungen mit Serumproteinen auftreten.<sup>[153]</sup> Allerdings können, wie in Kapitel 5.1 und 5.2.1.2 beschrieben, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Polymeren und entgegengesetzt geladenen Komponenten des Serums auftreten und dadurch eine Aggregation in Serum induzieren.<sup>[10]</sup> Des Weiteren ist aus Arbeiten von Hemmelmann und Mohr et al. bekannt, dass neben elektrostatischen auch hydrophobe Wechselwirkungen eine Aggregation erzeugen.<sup>[154]</sup> In Abbildung 5-19-a ist erkennbar, dass zur Beschreibung der Autokorrelationsfunktion der Poly-(MA-ELP) Bürste in Serum eine zusätzliche Aggregat beschreibende Funktion notwendig ist. Bei einem Streuwinkel von 30° werden Aggregate in der Größenordnung von R<sub>h</sub> = 280 nm gebildet, welche mit 38% zur Gesamtintensität beitragen. Diese Aggregation lässt sich wie schon bei

den succinylierten PLLs auf die Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Carboxylgruppen und den positiven Serumkomponenten zurückführen.

**Tabelle 5-7: Aggregation von Poly-(MA-ELP) in humanem Serum,  $R_h$  des Serums, des Poly-(MA-ELP) und der entstehenden Aggregate; Beitrag von Aggregat, Polymer und Serumproteinmischung an der Gesamitintensität in %.**

Winkel	$R_{hSer}/nm$	I% $R_{hSer}$	$R_{hPoly}/nm$	I% $R_{hPoly}$	$R_{hAGG}/nm$	I% $R_{hAGG}$
30°	41	60	23	2	277	38

Die ELP-Polymerbürste mit externen PEG<sub>6</sub>-Azidgruppen zeigt ebenfalls Aggregation in humanem Serum (Abbildung 5-19-b). Diese fällt allerdings im Vergleich zum Poly-(MA-ELP) sichtbar geringer aus.



**Abbildung 5-19: □ AKF von (a) Poly-(MA-ELP) und (b) Poly-(MA-ELP-PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>) in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel 30°; c = 0.02 g/L; Filter: HV 450 nm; GS 220 nm; λ = 632.8 nm, T=293 K.**

**Tabelle 5-8: Aggregation von Poly-(MA-ELP-PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>) in humanem Serum,  $R_h$  des Serums, des Poly-(MA-ELP-PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>) und der entstehenden Aggregate; Beitrag von Aggregat, Polymer und Serumproteinmischung an der Gesamitintensität in %.**

Winkel	$R_{hSer}/nm$	I% $R_{hSer}$	$R_{hPoly}/nm$	I% $R_{hPoly}$	$R_{hAGG}/nm$	I% $R_{hAGG}$
30°	34	0.86	34	0	160	0.14

Der Aggregatanteil von 14% an der Gesamtintensität lässt sich möglicherweise durch die ca. 10% nicht umgesetzten Carboxgruppen erklären.<sup>[152]</sup> Eine weitere Ursache kann die erhöhte Hydrophobie durch den geschützten C-Terminus sein, woraus sich auch die Übergangstemperatur von T = 27 °C bei 1g/L in PBS erklären lässt. Da generell Zelleexperimente bei

physiologisch relevanten 37 °C durchgeführt werden ist diese zu niedrig. Weiterhin konnte kürzlich von [REDACTED] gezeigt werden, dass die Übergangstemperatur auch nach Anbindung des Antikörpers aDEC205 sowie des Adjuvans CpG1826 nicht erhöht werden kann.<sup>[155]</sup> Demnach können diese Systeme nicht als „Nanocarrier“ für die Krebsimmuntherapie verwendet werden.

#### 5.2.4 Poly(2-oxazolin)bürsten

Im folgenden Kapitel werden die von [REDACTED] hergestellten Poly(2-oxazolin)bürsten hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht. Es konnten drei verschiedene Azid-funktionalisierte Poly(2-oxazolin)bürsten synthetisiert werden.<sup>[114, 148, 156]</sup>

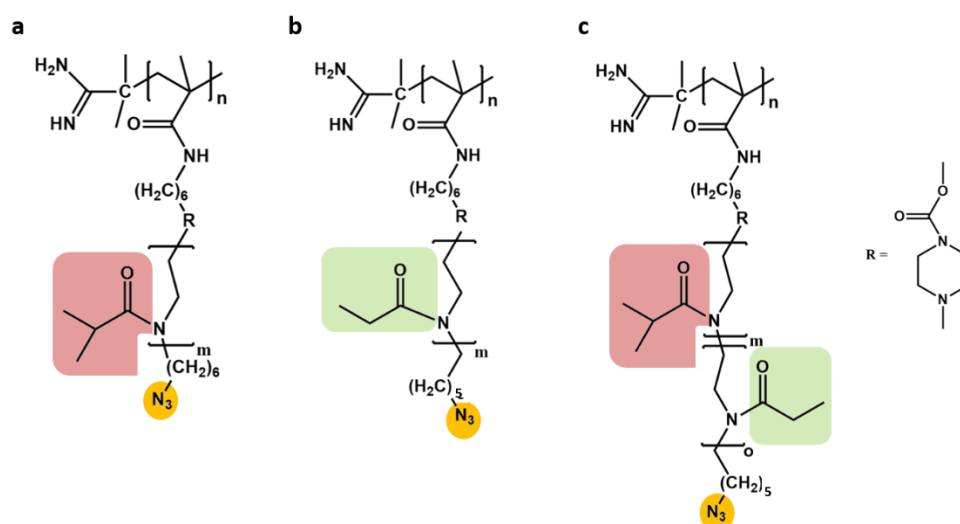


Abbildung 5-20: Strukturformeln der verschiedenen Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)-bürsten: (a) N<sub>3</sub>-PiPrOx-Bürste; (b) N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste und (c) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste.

Die Azid-funktionalisierten Polymere können entweder über kupferfreie Click-Chemie oder nach Reduktion der Azidgruppe zu primären Aminen mit Farbstoffen oder biologisch aktiven Komponenten (z. B. Antikörper, Peptide, Adjuvantien) markiert werden. Die Eigenschaften der drei verschiedenen Poly(2-oxazolin)bürsten sind in Tabelle 5-9 zusammengefasst.<sup>[114]</sup>

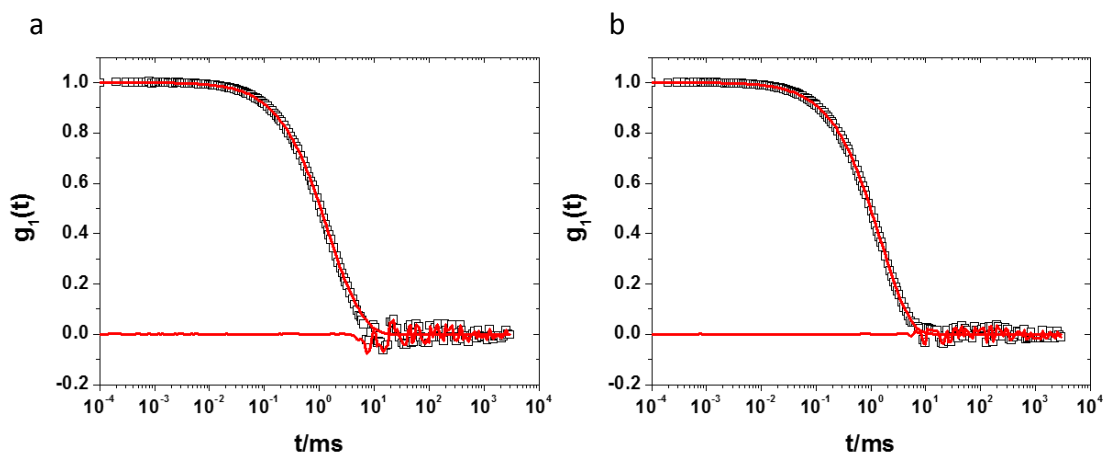
Tabelle 5-9: Lichtstreuerggebnisse sowie GPC-Ergebnisse der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in MeOH, 5 mM LiBr<sup>[114]</sup>

Probe	Mw/ g/mol(LS)	Rg/nm	Rh/nm	PDI (GPC)
N <sub>3</sub> -PiPrOx-Bürste	1.26*10 <sup>6</sup>	37.38	26	1.83
N <sub>3</sub> -PEtOx-Bürste	6.18*10 <sup>5</sup>	32.29	21	1.68
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste	3.21*10 <sup>6</sup>	60.53	42	2.47

### 5.2.4.1 Aggregation in humanem Serum

Für die Poly(2-oxazolin)e werden aufgrund der in Kapitel 3.6 beschriebenen Eigenschaften lediglich geringe oder sogar keine Wechselwirkungen mit Serumproteinen erwartet.

In Abbildung 5-21 sind die AKF der Mischungen aus Serum und der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste (a) sowie der Mischung aus Serum und der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (b) dargestellt. Diese beiden Polymere zeigen keine Aggregatbildung in humanem Serum.



**Abbildung 5-21:** □ AKF von (a) N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste und (b) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-iPrOx-Bürste in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; Streuwinkel 60°; c = 1 g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm; λ = 632.8 nm, T=293 K.

Im Gegensatz dazu neigen die N<sub>3</sub>-PiPrOx-Bürsten zur Aggregation in humanem Serum (Abbildung 5-22). In Tabelle 5-10 sind die erhaltenen Radien und Intensitätsbeiträge der Mischung aus Serum und der N<sub>3</sub>-PiPrOx-Bürste für die Streuwinkel 30° und 60° gezeigt. Die Größenordnung der erhaltenen Aggregate liegt zwischen 100 nm – 360 nm. Die Aggregation wird sehr wahrscheinlich durch die im Vergleich doch erhöhte Hydrophobizität der N<sub>3</sub>-PiPrOx-Bürste verursacht. Somit können hydrophobe Proteine, wie zum Beispiel Lipoproteine, mit den hydrophoben Polymerbürsten in Wechselwirkung treten und folglich eine Aggregation hervorrufen.<sup>[10, 154]</sup>

Im Vergleich dazu kann die nicht vorhandene Aggregation in humanem Serum der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste sowie der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste durch die ausreichend hohe Hydrophilie der Polymeroberflächen erklärt werden. Demnach wird im Fall der Kern-Schale-Bürste der hydrophobe PiPrOx-Block von dem hydrophilen PEtOx-Block abgeschirmt.

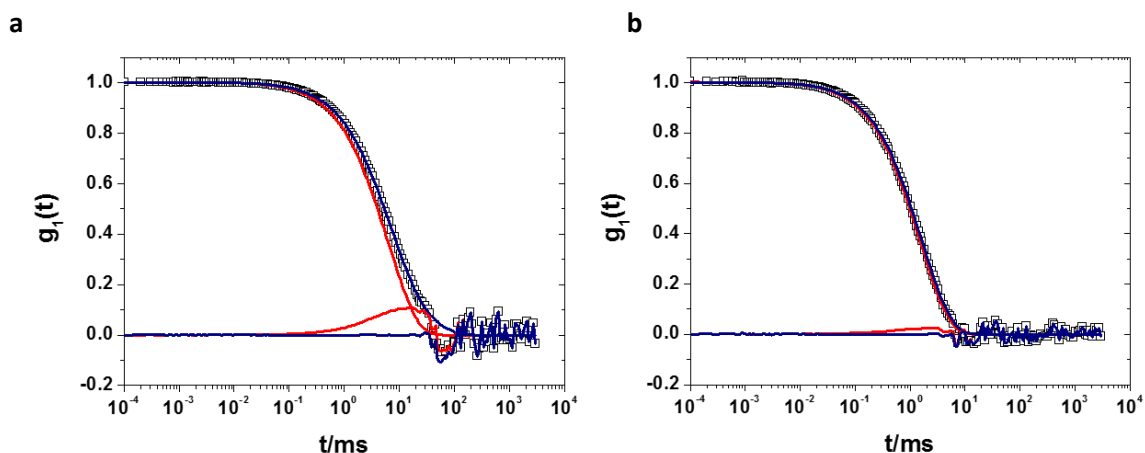


Abbildung 5-22:  $\square$  AKF der  $N_3$ -iPrOx-Bürste in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $30^\circ$  (a) und Streuwinkel  $60^\circ$  (b);  $c = 1$  g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8$  nm,  $T = 293$  K.

Tabelle 5-10: Aggregation der  $N_3$ -PiPrOX-Bürste in humanem Serum,  $R_h$  des Serums, der  $N_3$ -PiPrOX-Bürste und der entstehenden Aggregate; Beitrag von Aggregat, Polymer und Serumproteinmischung an der Gesamitintensität in %.

Winkel	$R_{hSer}/nm$	I% $R_{hSer}$	$R_{hPoly}/nm$	I% $R_{hPoly}$	$R_{hAGG}/nm$	I% $R_{hAGG}$
$30^\circ$	36	77	23.5	3	364	20
$60^\circ$	36	76	23.8	7	112	17

Nach Reduktion der Azid-funktionalisierten Polymerbürsten, mittels Staudinger-Reduktion, werden ungeladene Azide in positive geladene Amine überführt.<sup>[114]</sup> Demnach wird nach den in Kapitel 5.2.1.2 erhaltenen Ergebnissen auch hier eine ladungsinduzierte Aggregation in humanem Serum erwartet.

Wie in Abbildung 5-23-a-c gezeigt, wird in allen drei Fällen eine zusätzliche Aggregat beschreibende Fitfunktion benötigt. Tabelle 5-11 zeigt die hydrodynamischen Radien sowie die Intensitätsbeiträge für alle drei reduzierten Polymerbürsten bei einem Streuwinkel von  $30^\circ$ . Die gebildeten Aggregate liegen im Größenbereich von 350 nm. Demzufolge wird die obige Erwartung bestätigt. Eine Abschirmung der Ladungen, beispielsweise durch Konjugation von verschiedenen inerten Polymeren wie PEG oder PEtOx, könnte eine Möglichkeit darstellen diese Art von Aggregation zu verhindern.



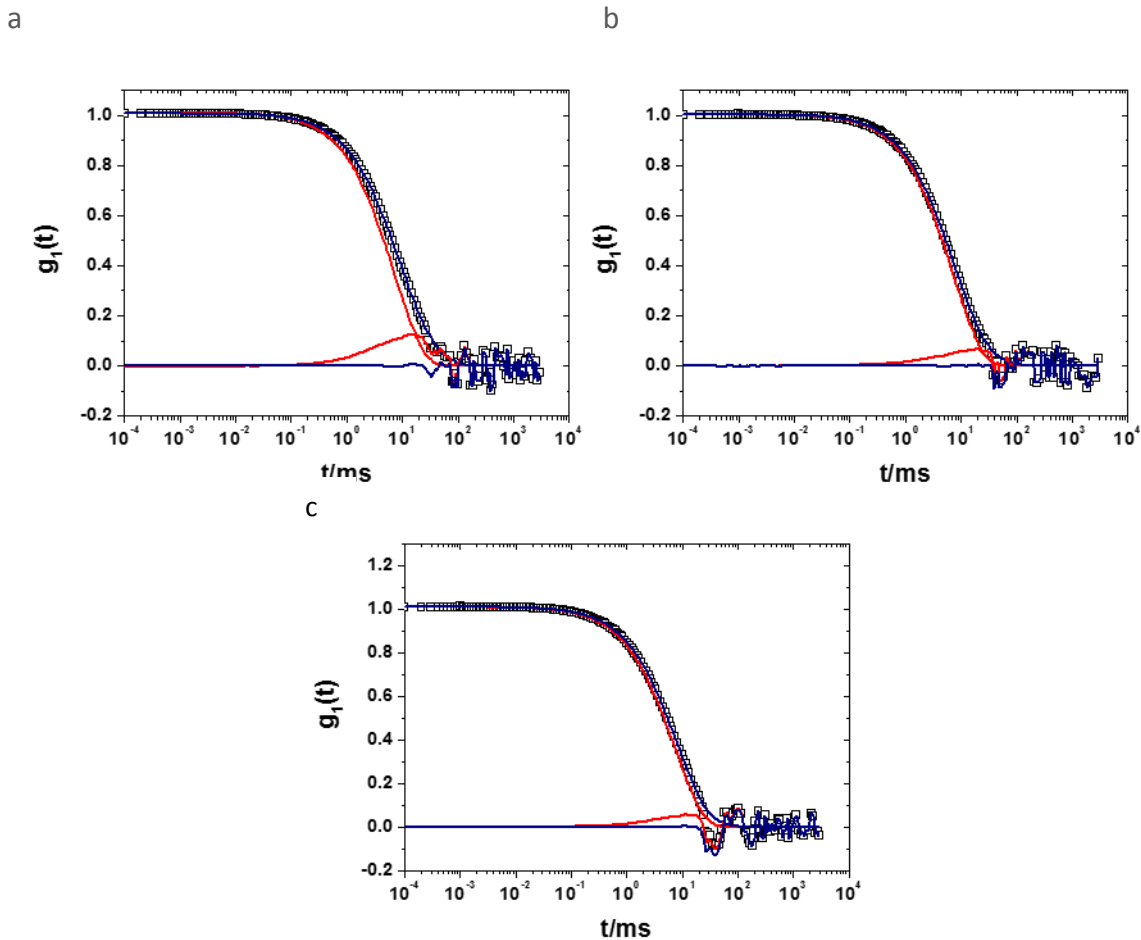


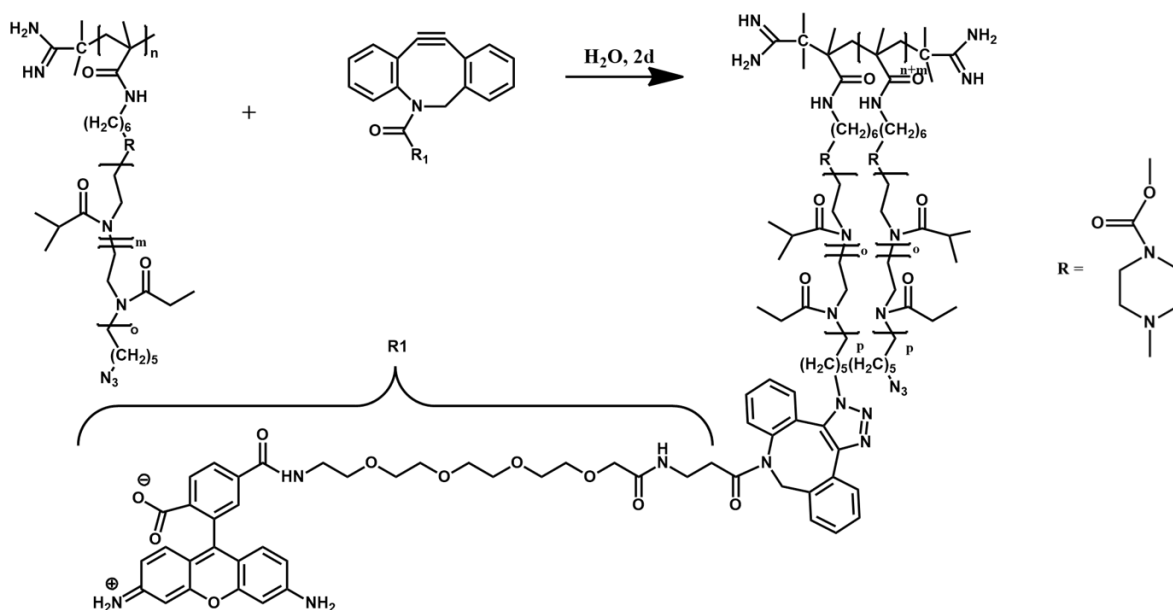
Abbildung 5-23:  $\square$  AKF der (a)  $\text{NH}_2$ -PEtOx-Bürste; (b)  $\text{NH}_2$ -PiPrOx-Bürste und (c)  $\text{NH}_2$ -PEtOx-b-iPrOx-Bürste in Serum --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c = 1 \text{ g/L}$ ; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T=293 \text{ K}$ .

Tabelle 5-11: Aggregation der  $\text{NH}_2$ -funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in humanem Serum,  $R_h$  des Serums, der  $\text{NH}_2$ -funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürste und der entstehenden Aggregate; Beitrag von Aggregat, Polymer und Serumproteinmischung an der Gesamitintensität.

$30^\circ$	$R_{h\text{Ser}}/\text{nm}$	I% $R_{h\text{Ser}}$	$R_{h\text{Poly}}/\text{nm}$	I% $R_{h\text{Poly}}$	$R_{h\text{AGG}}/\text{nm}$	I% $R_{h\text{AGG}}$
$\text{NH}_2$ -PiPrOx-Bürste	39	84	23	3	345	13
$\text{NH}_2$ -PEtOx-Bürste	39	74	24	1	335	25
$\text{NH}_2$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste	39	89	34	0	299	11

### 5.2.4.2 Zellaufnahmestudien

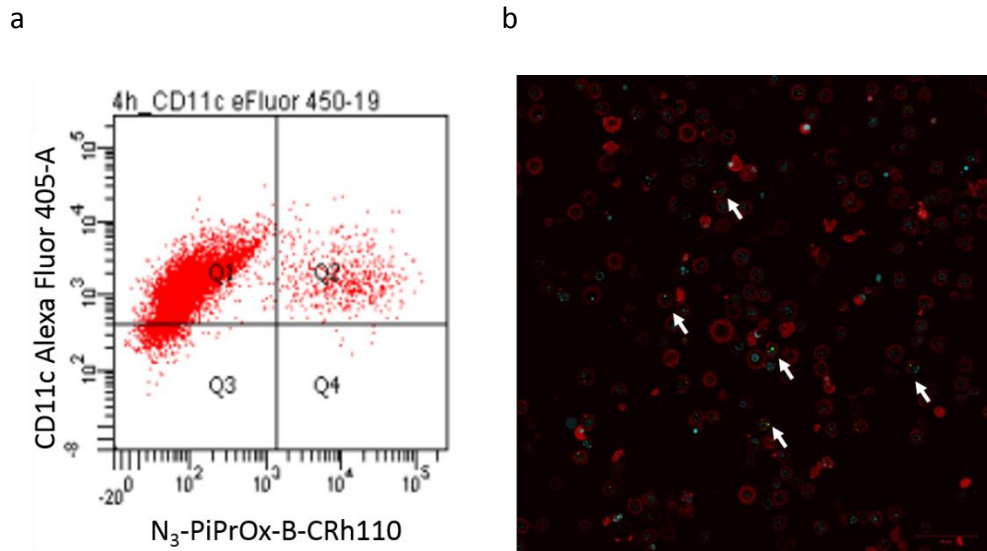
Für die Zellaufnahmestudien werden die drei Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)-bürsten, wie in Abschnitt 7.5.3.2 und 7.5.3.3 beschrieben, mittels kupferfreier Click-Chemie mit dem Farbstoff Carboxyrhodamin 110 bzw. AlexaFluor488 markiert. Die kupferfreie Click-Chemie zeichnet sich durch ihre nahezu quantitative Umsetzung sowie dem Ausbleiben von Nebenreaktionen aus.<sup>[157]</sup>



**Abbildung 5-24: Reaktionsschema zur Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten.**

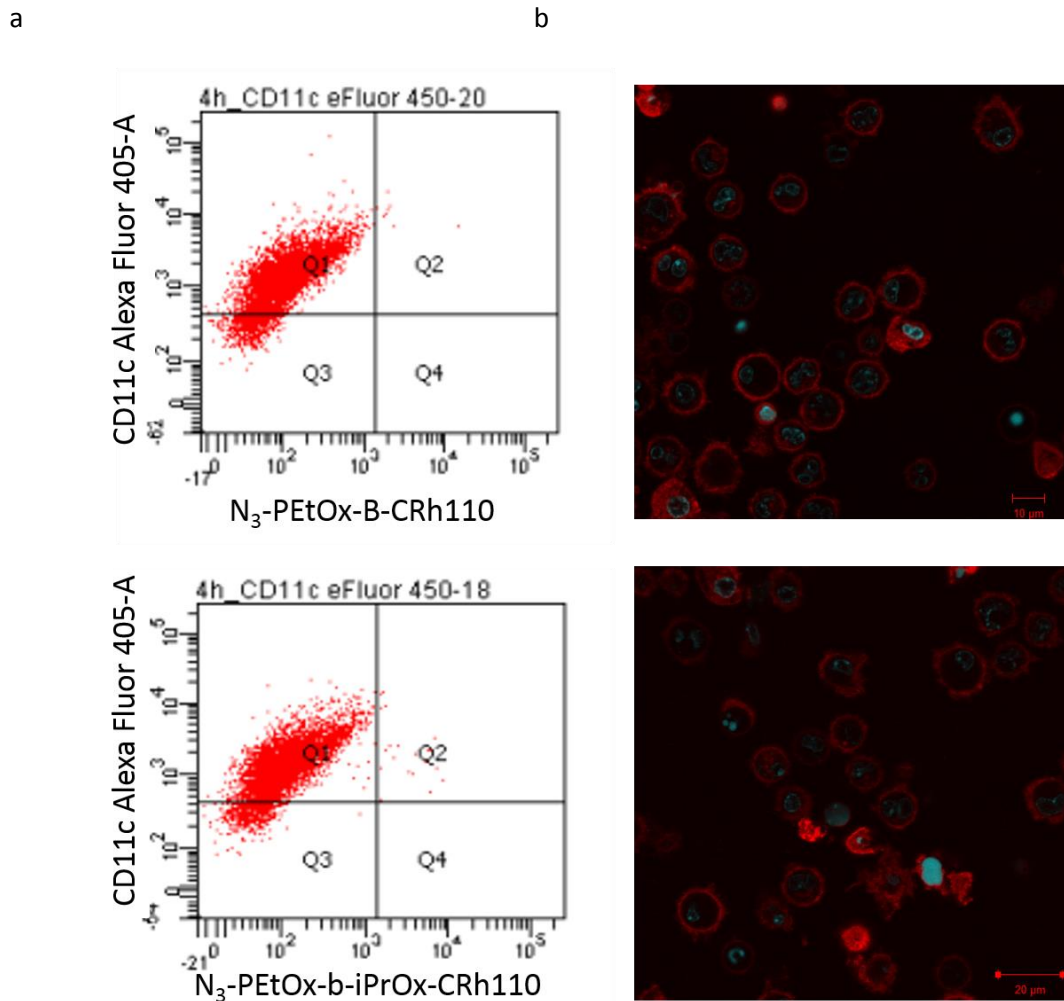
In Abbildung 5-25 ist die Zellaufnahme in BMDCs der Carboxyrhodamin110 markierten  $N_3$ -PiPrOx-Bürsten gezeigt. Aus der FACS-Messung wird eine unspezifische Aufnahme von 7,5% erhalten (Q2). Dieses Ergebnis kann mit Hilfe der CLSM-Aufnahmen bestätigt werden. Es sind sehr deutlich einige Zellen zu erkennen, welche das Polymer unspezifisch aufgenommen haben (grün). Dieses Verhalten kann wie schon bei der Aggregation in Serum auf die Hydrophobie der  $N_3$ -PiPrOx-Bürsten zurückgeführt werden. Aus den Arbeiten von Carré et al. ist bekannt, dass besonders hydrophobe Moleküle zur Zelladhäsion neigen und demnach von den Zellen teilweise aufgenommen werden.<sup>[158]</sup>

Des Weiteren weisen die  $N_3$ -PiPrOx-Bürsten in Folge ihrer Hydrophobie eine Phasenübergangstemperatur von  $T = 26\text{ °C}$  auf.<sup>[114]</sup> Da die in diesem Kapitel gezeigten Zellversuche bei  $37\text{ °C}$  durchgeführt werden ist diese zu niedrig und es kommt es zur Aggregation der Polymere.



**Abbildung 5-25:** Zellaufnahme der  $N_3$ -PiPrOx-Bürste in BMDCs nach 4h; (a) FACS-Messung und b) CLSM Aufnahmen; Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; türkis: Hoechst 33342-Nukleus; rot: Cell Mask Orange – Zellmembran; grün: Polymer.

Im Vergleich zur  $N_3$ -PiPrOx-Bürste werden die Carboxyrhodamin110 markierten  $N_3$ -PEtOx-Bürsten und die Carboxyrhodamin110 bzw. AlexaFluor488 markierten  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten aufgrund der erhöhten Hydrophilie und demnach geringen Wechselwirkungen mit der Zellmembran nicht von BMDCs aufgenommen (Abbildung 5-26). Da die beiden hydrophilen Azid-funktionalisierten Polymerbürsten ( $N_3$ -PEtOx-Bürste und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste) keine unspezifische Aufnahme in BMDCs und zudem keine Aggregation in humanem Serum zeigen, erfüllen sie zwei sehr wichtige Kriterien um als polymere Träger in der Krebsimmuntherapie in Betracht gezogen zu werden.



**Abbildung 5-26:** Zellaufnahme der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste (oben) und N<sub>3</sub>-PEtOx-b-iPrOx-Bürste (unten) in BMDCs nach 4h; (a) FACS-Messung und b) CLSM Aufnahmen; Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; türkis: Hoechst 33342-Nukleus; rot: Cell Mask Orange – Zellmembran; grün: Polymer(hier nicht zu sehen).

Des Weiteren wird in Zusammenarbeit mit der AG Steinbrink (Universitätsmedizin Mainz) die Zellaufnahme in humane DCs untersucht. In Abhängigkeit vom angebondenen Farbstoff werden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Das mittels Carboxyrhodamin110 markierte Polymer zeigt weitgehend keine Anbindung bzw. Aufnahme an bzw. in humanen DCs. Demgegenüber zeigt das mit AlexaFluor488 markierte Polymer eine von der Zeit und Dosis abhängige Zellanbindung bzw. Zellaufnahme (Tabelle 5-12). Da der Farbstoff Carboxyrhodamin110 elektrisch neutral ist und der Farbstoff AlexaFluor488 zweifach negativ geladen ist, hat die Anzahl der angebondenen Farbstoffe und damit verbunden die Nettoladung eventuell einen Einfluss auf die ungewollte Zellaufnahme. Für die in den nachfolgenden Versuchen verwendeten Polymerkonzentrationen konnte jedoch auch für die

mit AlexaFluor488 markierten Polymere keine maßgebliche Zellaufnahme detektiert werden. Jedoch sollte dieser Befund für weitere Zellversuche berücksichtigt werden, sodass in Zukunft zur Markierung von Polymeren oder Biomolekülen nach Möglichkeit auf ladungsneutrale bzw. zwitterionische Farbstoffe zurückgegriffen wird.

**Tabelle 5-12: Polymerbindung bzw. Polymeraufnahme an/in humane DCs**

Probe	4 h		18 h		48 h	
	1*10 <sup>6</sup> Partikel /1 Zelle	2*10 <sup>6</sup> Partikel /1 Zelle	1*10 <sup>6</sup> Partikel /1 Zelle	2*10 <sup>6</sup> Partikel/ 1 Zelle	1*10 <sup>6</sup> Partikel /1 Zelle	2*10 <sup>6</sup> Partikel/ 1 Zelle
CRh110-N <sub>3</sub> -PEtOx-b- PiPrOx-Bürste	1.6%	1.8%	2.4%	3.2%	2.7%	3.4%
AF488-N <sub>3</sub> -PEtOx-b- PiPrOx-Bürste	2.7%	1.5%	<b>4.4%</b>	<b>5.3%</b>	<b>6.8%</b>	<b>12.9%</b>

### 5.2.5 Zusammenfassung

Lineares PLL konnte erfolgreich zu fünf verschiedenen Graden (37%; 49%; 60%; 70%; 100%) succinyliert werden. Die Succinylierung zeigte keinen Einfluss auf die hydrodynamischen Radien der Polymere. Die Aggregation in humanem Serum wurde mittels DLS untersucht. Durch die Überführung der positiven Aminogruppen in negative Carboxylatgruppen wurden generell weniger Aggregate detektiert. Bei einem Succinylierungsgrad von 49% und somit einem nahezu ladungsneutralen Polymer lag die Amplitudenintensität der Aggregate bei lediglich 8% und konnte somit vernachlässigt werden. Für die Succinylierungsgrade 60%, 70% und 100% wurden aufgrund der nun überwiegenden negativen Ladungen und der damit verbundenen Wechselwirkungen mit den kationischen Komponenten des Serums erneut Aggregate erhalten.

In den Zellaufnahmestudien wurde gezeigt, dass die Aufnahme in BMDCs mit zunehmenden Succinylierungsgrad abnahm, bei einem Succinylierungsgrad von 50% die unspezifische Aufnahme nahezu vollständig unterdrückt wurde und schließlich bei überwiegender negativer Ladung wieder etwas zunahm.

Die Succinylierung wurde erfolgreich auf die PLL-Bürste übertragen. Es konnten drei verschiedene Succinylierungsgrade eingestellt werden (20%; 37%; 50%). Diesmal hatte die Succinylierung einen leichten Einfluss auf die hydrodynamischen Radien der Polymere.

Da bei den succinylierten PLL-Bürsten sehr wahrscheinlich nur die äußeren positiven Aminogruppen zu den negativen Carboxylatgruppen umgesetzt wurden, besitzen die succinylierten PLL-Bürsten je nach Succinylierungsgrad eine nach außen hin positive oder negative Nettoladung. Demnach zeigten alle succinylierten PLL-Bürsten aufgrund von Ladungswechselwirkungen zwischen Polymer und Proteinen des Serums, eine Tendenz zur Aggregation. Diese fällt jedoch im Vergleich zum reinen PLL viel geringer aus. Somit können diese Systeme als mögliche polymere Trägersysteme für biomedizinische Anwendungen in Betracht gezogen werden. Über die noch verfügbaren Aminogruppen konnten die succinylierten PLLs/PLL-Bürsten mit Hilfe von AlexaFluor488 markiert werden.

Die zwei von [REDACTED] synthetisierten Elastin-ähnlichen Polypeptide, welche sich lediglich am C-Terminus unterscheiden, führten beide zur Aggregation in humanem Serum. Hierbei wurden für die am C-Terminus Carboxyl-funktionalisierten Polymerbürsten eine deutlich stärkere Aggregation im Vergleich zu den Polymerbürsten, bei denen die negativen Carboxylgruppen zu 90% mit PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> in neutrale Azide überführt wurden, erhalten. Aufgrund der niedrigen Übergangstemperatur von  $T = 27\text{ °C}$  können diese Systeme nicht weiter als „Carrier“ für biomedizinische Anwendungen verwendet werden, da die physiologisch relevante Temperatur bei  $37\text{ °C}$  liegt.

Für die von [REDACTED] hergestellten Azid-funktionalisierten N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürsten und N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten wurden mittels DLS keine Aggregate in humanem Serum detektiert. Hingegen wurden für die N<sub>3</sub>-PiPrOx-Bürsten Aggregate erhalten. Diese wurden durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Polymer und hydrophoben Serumproteinen verursacht. Nach Überführung der Azidgruppen in Aminogruppen zeigten alle Polymerbürsten eine Tendenz zur Aggregation in humanem Serum, welche wiederum sehr wahrscheinlich durch Wechselwirkungen der kationischen Polymerbürsten mit anionischen Serumproteinen verursacht wurden.

Die Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten erfolgte mittels kupferfreier Click-Chemie.

Die Zellstudien zeigten für die hydrophilen N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürsten und N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten keine unspezifische Aufnahme in BMDCs. Hingegen wurden die hydrophoben N<sub>3</sub>-PiPrOx-

Bürsten in geringen Mengen unspezifisch von BMDCs aufgenommen. Die mittels Carboxy-rhodamin markierten  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten zeigten keine Zellaufnahme in humane DCs. Hingegen wurden für die mit AlexaFluor488 markierten  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten eine von der Konzentration abhängige Zellaufnahme erhalten, die jedoch weit über dem für uns relevanten Bereich liegen.

In Folge dieser Ergebnisse scheinen die beiden hydrophilen Azid-funktionalisierten Polymerbürsten ( $N_3$ -PEtOx-Bürste und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste) ideale polymere Trägersysteme für die Anwendung in der Krebsimmuntherapie zu sein.

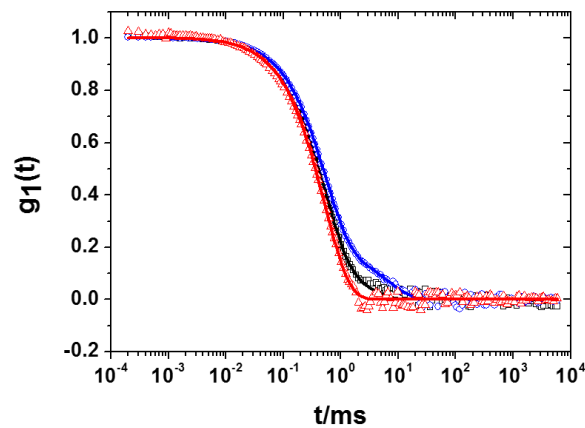
### 5.3 Charakterisierung sowie Modifizierung des Antikörpers aDEC205

In ihrer Dissertation konnte [REDACTED] zeigen, dass der Antikörper aDEC205 ein vielversprechender Kandidat zur Adressierung CD8+ dendritischer Zellen darstellt.<sup>[8]</sup> Demzufolge wird im Rahmen dieser Arbeit zuerst mit dem Antikörper aDEC205 weitergearbeitet. Als erstes wird versucht, die von [REDACTED] erhaltenen Ergebnisse zur Charakterisierung und Farbstoffmarkierung des Antikörpers zu reproduzieren. Weiterhin soll der Antikörper mit der zur kupferfreien Click-Chemie notwendigen funktionellen Gruppe Dibenzocyclooctin (DBCO oder DIBO) möglichst aggregatfrei modifiziert und auf seine Bindungsaffinität an dendritischen Zellen getestet werden.

#### 5.3.1 Untersuchung von aDEC205 nach unterschiedlicher Filtration mittels DLS

Der von *BioXCell* erworbene monoklonale Antikörper aDEC205 (NLDC-145) wird nach unterschiedlicher Filtration (200 nm, 20 nm und Zentrifugenfiltration PALL 300 kDa) mit Hilfe der DLS untersucht. In Abbildung 5-27 sind die experimentellen Autokorrelationsfunktionen nach den drei verschiedenen Filtrationen von aDEC205 bei einem Streuwinkel von 30° dargestellt. Für den durch einen GHP 200 nm Filter (blau) und den mittels eines Anotop 20 nm Filters (schwarz) filtrierte Antikörper aDEC205 lassen sich jeweils zwei Moden unterscheiden. Bei dem Fastmode handelt es sich um das reine Protein und bei dem Slowmode entweder um eine Verunreinigung der Probe mit höher molekularen Substanzen oder um Proteinaggregate. Diese beiden AKF können jeweils mit Hilfe einer biexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden. Im Gegensatz dazu wird für den mittels Zentrifugenfiltration (Pall 300 kDa) aufgereinigten Antikörper aDEC205 (rot) eine reine monodisperse AKF erhalten.





**Abbildung 5-27: Experimentelle AKF und deren Fits von aDEC205 in 1X PBS: --- GHP 200 nm; --- Anotop 20 nm; --- PALL 300 kDa; T = 293 K; Streuwinkel 30°.**

Die sich aus der biexponentiellen bzw. monoexponentiellen Fitfunktion bei einem Streuwinkel von 30° ergebenden hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 5-13 angegeben. Für alle drei Filtrationstechniken wird für aDEC205 ein hydrodynamischer Radius von ca. 5 nm – 5,5 nm erhalten. Die nach GHP 200 nm und Anotop 20 nm Filtration erhaltenen „Slowmodes“ besitzen Größenordnungen von 20 nm - 60 nm und tragen mit 15% - 20% zur Gesamtintensität bei.

**Tabelle 5-13: Vergleich der hydrodynamischen Radien von  $\alpha$ DEC205 in 1XPBS; 200 nm GHP, 20 nm Anotop und 300 kDa PALL filtriert.**

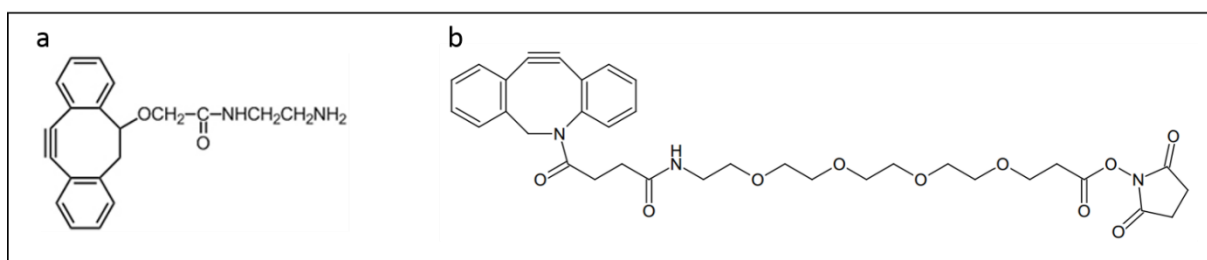
30°	Fit	$R_{h(aDEC205)}/nm$	I% $R_{h(aDEC205)}$	$R_{h(AGG)}/nm$	I% $R_{h(AGG)}$
<b>GHP 200 nm</b>	Biexp.	5.40	80	66.0	20
<b>Anotop 20 nm</b>	Biexp.	5.06	85	26.6	15
<b>Pall 300 k</b>	Monoexp.	5.25	100	/	/

### 5.3.2 Farbstoffmarkierung von aDEC205

Der Antikörper aDEC205 wird wie in Kapitel 7.5.2 beschrieben, nach Modifizierung des Standardprotokolls von *Invitrogen*<sup>[159]</sup> über Lysine mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor647-NHS-Ester markiert. Die Anzahl der Farbstoffe pro Antikörper wird mittels UV-VIS Spektroskopie und Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie bestimmt (siehe Abschnitt 7.5.2). Nach beiden Methoden wird eine Markierungseffizienz von 3-4 Farbstoffe pro Antikörper erhalten (siehe Abbildung 7-3).

### 5.3.3 DBCO-Markierung von aDEC205

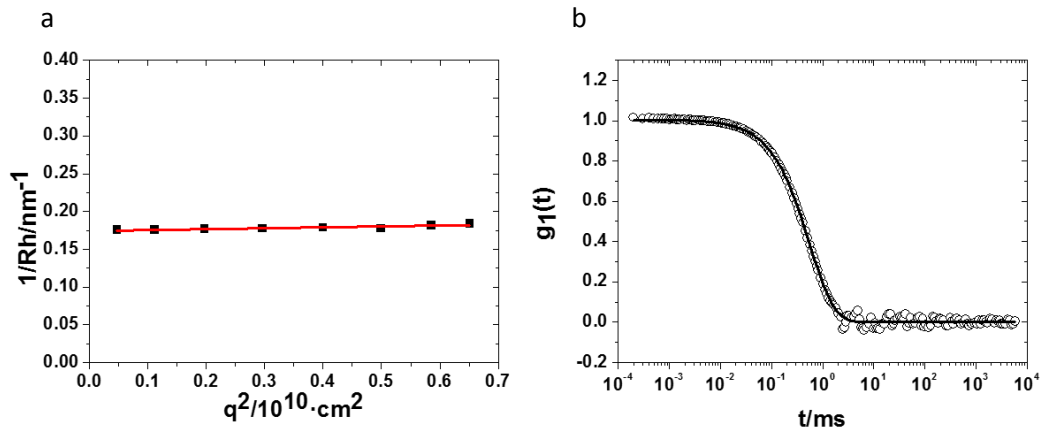
Um den Antikörper aDEC205 später über kupferfreie Click-Chemie an ein Azid-funktionalisiertes Polymer anzubinden, muss dieser zunächst entsprechend funktionalisiert werden. Hierzu ist der heterobifunktionelle Linker Dicyclobenzocyclooctin *N*-Hydroxysuccinimidylester (DIBO-NHS oder DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS) geeignet.



**Abbildung 5-28: Strukturformeln: (a) DIBO-NHS; (b) DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS**

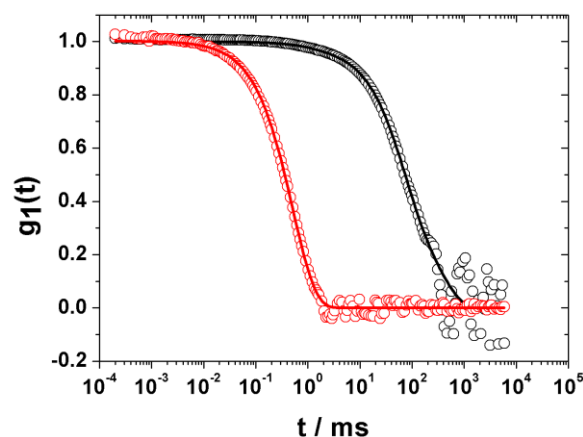
Ein großer Nachteil dieses Linkers ist jedoch die hohe Hydrophobizität, wodurch eine sehr starke Aggregatbildung in wässrigen Lösungen induziert wird. Von einer Konjugation in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO), bei der keine Aggregation des Linkers stattfindet, ist jedoch aufgrund der verminderten Stabilität sowie Aktivität des Antikörpers abzusehen.

Demnach wird im folgenden Abschnitt eine aggregatfreie Synthese des DBCO-PEG<sub>4</sub>-markierten Antikörpers aDEC205 im wässrigen Medium beschrieben. Der Antikörper aDEC205 wird vor der Umsetzung mit dem heterobifunktionellen Linker DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS mit einem Anotop 20 nm Filter bzw. Pall 300 kDa Zentrifugenfilter filtriert und mittels DLS vermessen (Abbildung 5-29). Hierbei wird ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 5$  nm erhalten.



**Abbildung 5-29: aDEC205 nach Anotop 20 nm Filtration: (a) Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius; (b)  $\circ$  experimentelle AKF; --- Biexponentieller Fit; Streuwinkel  $30^\circ$ ; 293 K;  $\lambda = 632.8$  nm;  $c = 2$  g/L in 1XPBS;  $R_h = 5$  nm.**

Die Zugabe des Linkers, nach vorangegangener Filtration und anschließender Überprüfung auf Verunreinigung oder Aggregation mittels DLS, kann entweder stöchiometrisch oder in einem 10-fachen Überschuss erfolgen. Für beide Varianten werden die gleichen Ergebnisse erhalten. Nach erfolgter Reaktion (24 h Inkubationszeit,  $4^\circ C$ ) wird das Reaktionsgemisch zunächst ohne weitere Aufreinigung mittels DLS untersucht. In Abbildung 5-30 ist die AKF nach 450 nm GHP Filtration (schwarz) gezeigt<sup>2</sup>. Die AKF ist im Vergleich zum reinen Antikörper aDEC205 (rot) zu weitaus größeren Korrelationszeiten verschoben, was auf das Vorhandensein von deutlich größeren Partikeln, beispielsweise Aggregate, hinweist. Es wird ein gemittelter hydrodynamischer Radius von ca. 350 nm erhalten.

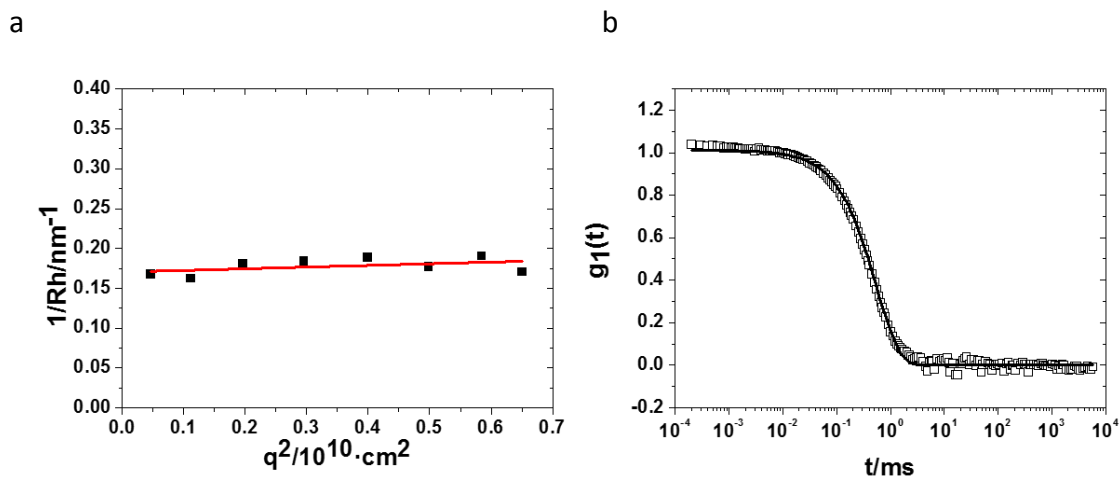


**Abbildung 5-30: --- aDEC205 nach Pall 300 kDa, monoexponentieller Fit,  $R_h = 5$  nm; --- aDEC-PEG4-DBCO ohne Aufreinigung nach GHP 450 nm Filtration,  $R_h \sim 350$  nm;  $\circ$  experimentelle AKF; Biexponentieller Fit; Streuwinkel  $30^\circ$ ; 293 K;  $\lambda = 632.8$  nm;  $c = 2$  g/L in 1XPBS.**

<sup>2</sup> Messung wurde von [redacted]-Arbeitsgruppe [redacted] Physikalische Chemie- durchgeführt

Die Abtrennung der Aggregate erfolgt mittels Zentrifugenfiltration (Pall 300 kDa). Durch anschließende Zentrifugenfiltration des nach Pall 300 kDa erhaltenen Filtrats mit Amiconzentrifugeneinheiten (Amicon 10 kDa) wird der Überschuss an nicht reagiertem Linker abgetrennt.

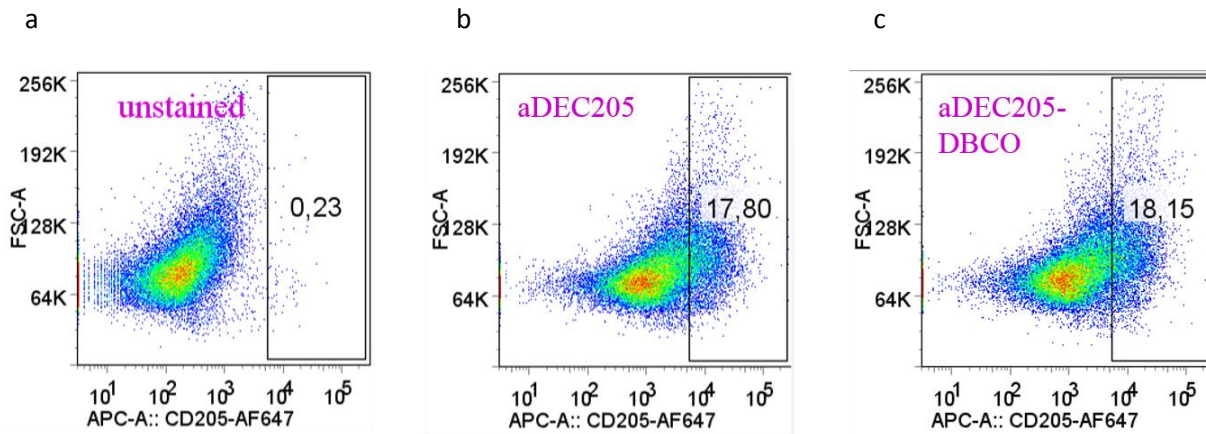
Abbildung 5-31 zeigt die aus der DLS ermittelten Ergebnisse des aufgereinigten Antikörpers. Für den DBCO-modifizierte Antikörper aDEC205 wird ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 5,9$  nm erhalten. Die Effizienz der DBCO-Funktionalisierung wird mit Hilfe des in Abschnitt 7.5.5.3 beschriebenen Assays auf 1,5 DBCO-Moleküle pro Antikörper bestimmt. Ausgehend vom unfiltrierten Antikörper aDEC205 (vgl. Abschnitt 5.3.1) werden in verschiedenen Ansätzen Ausbeuten von jeweils circa 20-30% erhalten. Somit kann der nun DBCO-funktionalisierte Antikörper zur weiteren Reaktionen mit Azid-funktionalisierten Polymeren verwendet werden.



**Abbildung 5-31: aDEC205-PEG4-DBCO aufgereinigt mittels Pall 300k und Amicon 10k; LG200 nm Filtration: (a) Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius; (b)  $\circ$  experimentelle AKF; --- Monoxponentieller Fit; Streuwinkel  $30^\circ$ ; 293 K;  $\lambda = 632.8$  nm;  $c = 0.5$  g/L;  $R_h = 5.86$  nm.**

Die Bindungsaffinitäten des DBCO-funktionalisierten und nichtfunktionalisierten Antikörper aDEC205 werden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die beiden Antikörper werden jeweils für 20 min bei  $4^\circ C$  mit BMDCs inkubiert.

Als Ergebnis wird sowohl für den nichtfunktionalisierten als auch für den DBCO-markierten Antikörper aDEC205 eine Bindung von circa 18% erhalten (Abbildung 5-32). Somit hat die DBCO-Markierung keinen negativen Einfluss auf die Zellanbindung. Dies bedeutet, dass die Bindungsaffinität des Antikörpers, trotz statistisch verteilter Modifizierung der Lysin-Einheiten am Antikörper, erhalten bleibt.



**Abbildung 5-32: FACS-Messung; (a) Zellen ohne Partikel; (b) aDEC205; (c) aDEC205-DBCO; Inkubationszeit 20min bei 4°C, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; Färbung mittels des Sekundärantikörpers goat anti-ratIgG-AF647, 15min bei 4°C.**

### 5.3.4 Zusammenfassung

Für den Antikörper aDEC205 konnten nach Filtration durch 200 nm und 20 nm Filter hydrodynamische Radien von  $R_h = 5 - 5,4$  nm erhalten werden, wobei stets ein Slowmode im Größenbereich von  $R_h = 26 - 66$  nm detektiert werden konnte. Erst eine Pall 300 kDa Zentrifugenfiltration führte zu monodispersen unimolekular gelösten Antikörper, der mit einer monoexponentiellen Fitfunktion in der DLS beschrieben werden konnte.

Es konnten 3-4 AlexaFluor647 Farbstoffmoleküle über Lysin an den Antikörper aDEC205 angebunden werden.

Durch Anwendung verschiedener Filtrationstechniken (Anotop 20 nm, Pall 300 kDa, Amicon 10 kDa) war eine aggregatfreie DBCO-Modifizierung des Antikörpers aDEC205 möglich. Die DBCO-Markierung zeigte keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität an dendritische Knochenmarkzellen.

## 5.4 Polymerkonjugate

Das Fernziel dieser Arbeit ist die Konjugation von drei bioaktiven Komponenten (Antikörper, Antigen, Adjuvans) an zylindrische Polymerbürsten (bzw. nach Fraktionierung dieser Bürsten an die verschiedenen Topologien (siehe Abschnitt 5.5): Wurmartige- und ellipsoidartige Bürsten sowie Kugeln) und deren anschließende Charakterisierung *in vitro* und *in vivo*.

Aufgrund der Polyfunktionalität des Trägers und der drei bioaktiven Komponenten ist dies ein anspruchsvolles Ziel. Aus diesem Grund werden zu Beginn dieser Arbeit, zur Erarbeitung der Konjugationschemie lineares PLL bzw. lineares succinyliertes PLL als Träger verwendet und im Anschluss die Erkenntnisse auf die Polymerbürsten übertragen. PLL ist im Gegensatz zu den unter hohem Aufwand präparativ zugänglichen Polymerbürsten kommerziell erhältlich. Zur Verknüpfung zweier Makromoleküle miteinander, sollten die beiden Moleküle die erforderlichen funktionellen Gruppen besitzen. Diese können mit Hilfe heterobifunktioneller niedermolekularer Linker eingeführt werden. Um die sterische Hinderung zu vermindern sind die reaktiven Gruppen solcher Linkermoleküle über einen Spacer („Abstandshalter“) verknüpft. Damit eine selektive Chemie ermöglicht wird, sollte der Linker bioorthogonale Gruppen besitzen.

### 5.4.1 PLL-aDEC205, Succ-PLL-aDEC205 und Succ-PLL-Bürste-aDEC205

#### 5.4.1.1 Synthese

Im Rahmen von [REDACTED] Dissertation konnte der Antikörper aDEC205 über zwei verschiedene Syntheserouten an PLL konjugiert werden.<sup>[8]</sup> In der vorliegenden Arbeit soll zuerst die Konjugation von aDEC205 an lineares PLL, mit Hilfe von wenigen Modifikationen reproduziert und die Konjugationschemie auf succinyliertes PLL sowie die succinylierte PLL-Bürste übertragen werden. In Abbildung 5-33 ist eine Übersicht zur Synthese des aDEC205-Polymer Konjugats gezeigt. Die Antikörper-Polymer Konjugate werden mittels kupferfreier Click-Chemie synthetisiert. In einem ersten Schritt wird der Antikörper aDEC205 über Lysine, wie in Kapitel 7.5.5.1 beschrieben, mit dem heterobifunktionellen Linker *N*-Hydroxysuccinimidylester Dicyclobenzocyclooctin (NHS-DIBO) modifiziert. Gleichzeitig wird PLL (bzw. succ-PLL, succ-PLL-Bürste) mit *N*-Hydroxysuccinimidylester-PEG<sub>12</sub>-Azid (NHS-PEG<sub>12</sub>-N<sub>3</sub>) ebenfalls über seine freien Aminogruppen funktionalisiert. Demzufolge kann das nun Azid-funktionalisierte Polymer mit der Alkingruppe des DIBO-funktionalisierten Antikörpers unter

Ausbildung eines Triazols reagieren. Im Fall des linearen Polymers erfolgt die Aufreinigung des Antikörper-Polymer Konjugats mit Hilfe von Amiconzentrifugeneinheiten (100 kDa). Allerdings wird hierbei lediglich das nicht reagierte Polymer ( $M_n = 7.500 \text{ g/mol}$ ) abgetrennt. Der nicht reagierte Antikörper aDEC205 (150.000 g/mol) kann auf Grund des ähnlichen Molekulargewichts zum aDEC-Polymer Konjugats (ca. 160.000 g/mol) nicht isoliert werden. Da die Polymerbürsten ein viel höheres Molekulargewicht ( $M_n \sim 4.5 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$ ) im Vergleich zum aDEC205 (150.000 g/mol) aufweisen, wird zur Abtrennung des freien Antikörpers auf „PALL Nanosep Devices 300 kDa“ zurückgegriffen.

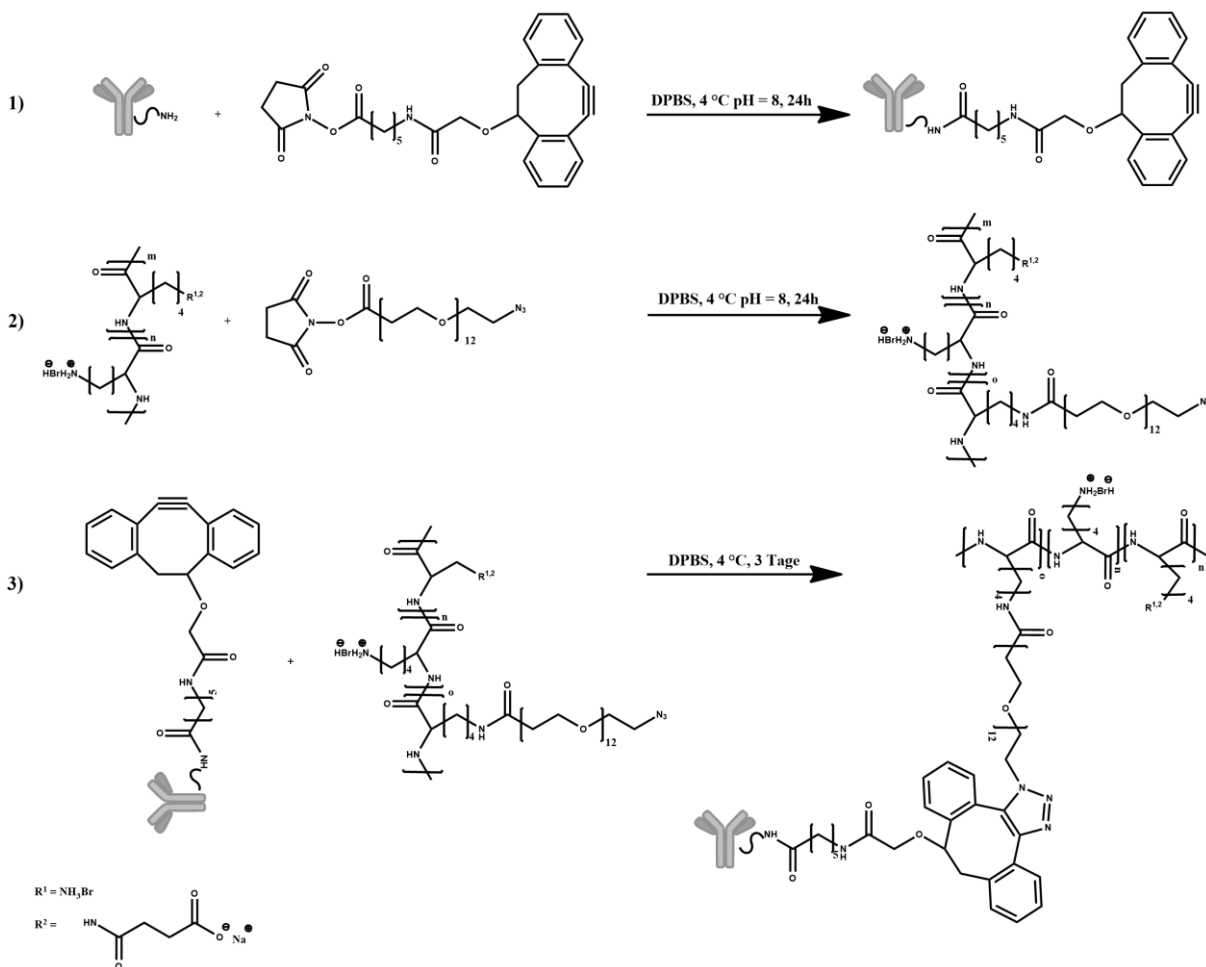


Abbildung 5-33: Reaktionsschema zur Konjugation von aDEC205 an PLL und Succ-PLL

#### 5.4.1.2 Charakterisierung

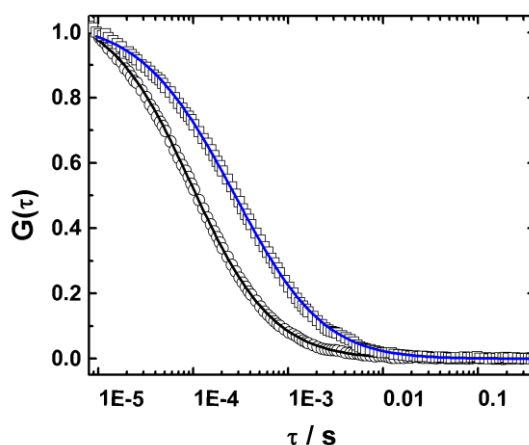
Die Anzahl der an das Polymer gebundenen Antikörper aDEC205 Moleküle wird mittels UV-VIS Spektroskopie bestimmt. Hierzu wird das Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 495 \text{ nm}$  des AlexaFluor488 markierten Polymers ins Verhältnis zum Absorptionsmaximum bei

$\lambda = 650$  nm des AlexaFluor647 markierten Antikörpers gesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5-14 dargestellt.

**Tabelle 5-14: PLL/succ-PLL/succ-PLL-Bürsten-Antikörper-Konjugate**

Probe	Polymer	Antikörper
PLL-aDEC205	1	1
37%-Succ-PLL-aDEC205	1	1
37%-Succ-PLL-Bürste-aDEC205	1	7
50%-Succ-PLL-Bürste-aDEC205	1	10

Da mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie nicht eindeutig unterschieden werden kann, ob der Antikörper frei oder am Polymer gebunden vorliegt, werden die synthetisierten Konjugate mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) untersucht (in Zusammenarbeit mit XXXXXXXXXX, MPIP).



**Abbildung 5-34: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- PLL-AF488 und --- PLL-AF488-aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 488$  nm,  $T = 295.15$  K.**

In Abbildung 5-34 sind beispielhaft die FCS-AKF des freien PLLs (schwarz) und die FCS-AKF des PLL-aDEC205 Konjugats (blau) bei einer Anregung mit  $\lambda = 488$  nm gezeigt. Erwartungsgemäß ist die AKF des PLL-aDEC205 Konjugats zu größeren Diffusionszeiten verschoben. Dies ist ein erster Hinweis auf die erfolgreiche Konjugation. Der hydrodynamische Radius der jeweiligen Proben kann über die Stokes-Einstein-Beziehung bestimmt werden. Der Diffusionskoeffizient wird aus der Beziehung zwischen Diffusionszeit



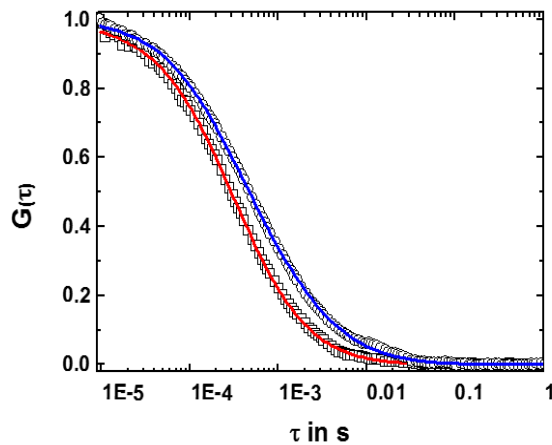
und konfokalem Detektionsvolumen erhalten. Tabelle 5-15 zeigt die mittels FCS erhaltenen Werte der hydrodynamischen Radien sowie deren prozentualen Anteil in der Gesamtmischung.

**Tabelle 5-15: Nach FCS ermittelte hydrodynamische Radien sowie deren %-Anteilen in der Gesamtmischung, Anregung,  $\lambda = 488$  nm.**

Probe	$R_{h(PLL)}/nm$	$R_{h(Konjugat)}/nm$
PLLAF488-aDEC205AF647	2.0 (30%)	8.4 (70%)
37%-Succ-PLLAF488-aDEC205AF647	1.9 (65%)	8.3 (35%)

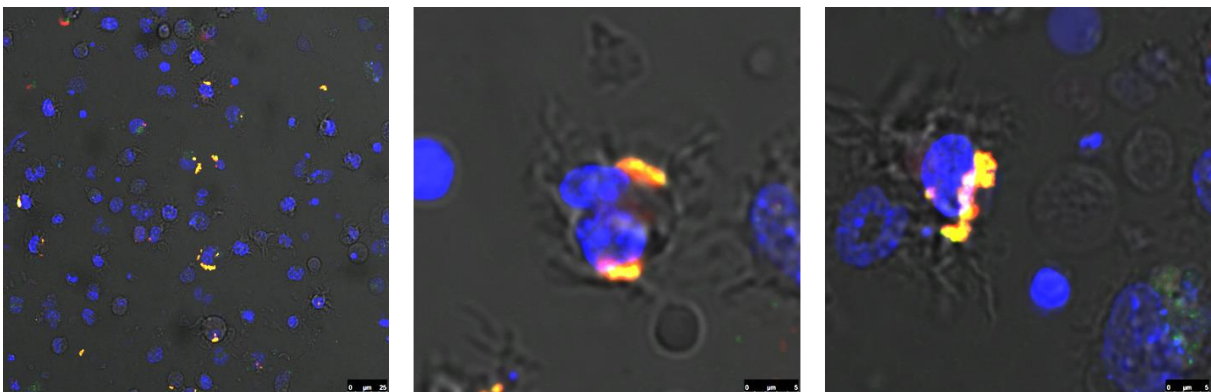
Die AKF der Polymerkonjugate werden mittels eines freien Zweikomponentenfits beschrieben. Hierbei beschreibt die eine Komponente das freie Polymer und die andere das Polymer-Antikörper Konjugat. Somit wird für das PLL-aDEC205 Konjugat ein Anteil von 30% freiem Polymer und für das 37%-succ-PLL-aDEC205 Konjugat sogar ein Anteil von 65% freiem Polymer detektiert. Eine Erklärung für den beachtlich großen Anteil von nicht umgesetztem Polymer im Fall des 37%-succinylierten PLLs kann in der Überführung der Aminogruppen in Carboxylatgruppen liegen. Demnach können ionische Wechselwirkungen zwischen den Ammonium- und Carboxylationen auftreten. Diese üben möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Reaktivität des Polymers aus.

Die FCS-Ergebnisse der PLL-Bürsten Konjugate sind am Beispiel des 37%-succinylierten PLL-Bürsten-aDEC205 Konjugats sowie einer Negativkontrolle (37%-succinlyierte PLL-Bürste-AF488 + unmodifizierter Antikörper aDEC205-AF647) in Abbildung 5-35 dargestellt. Anstelle des blauen Lasers wird diesmal aufgrund der geringen Unterschiede der hydrodynamischen Radien vom Polymer und des Polymer-aDEC205 Konjugat mit Hilfe des roten Lasers ( $\lambda = 633$  nm) angeregt, um so eine mögliche Verschiebung der Korrelationszeiten des Antikörpers (nach Konjugation) detektieren zu können. Für die Negativkontrolle wird erwartungsgemäß ein dem freien Antikörper aDEC205-AF647 entsprechenden hydrodynamischer Radius von  $R_h = 6$  nm erhalten. Die AKF des Konjugats ist anders als erwartet nur geringfügig zu größeren Korrelationszeiten verschoben. Dies deutet darauf hin, dass neben dem Konjugat noch freier Antikörper aDEC205 vorliegt.



**Abbildung 5-35:** FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- Mischung: 37%-Succ-PLL-B-AF488 + unmodifizierte aDEC205-AF647 (Kontrolle) und --- 37%-Succ-PLL-B-AF488-aDEC205-AF647 in 1X PBS, T= 295.15 K,  $\lambda = 633$  nm.

In Abbildung 5-36 sind die CLSM-Aufnahmen zur Zellaufnahme der Polymerbürsten-aDEC205 Konjugate in BMDCs gezeigt. Es lässt sich eine Superposition der beiden Farbstoffe (grün + rot = gelb) am Zellrand erkennen. Somit wird dieses Konjugat nicht von den Zellen aufgenommen sondern nur angelagert. Eine mögliche Ursache könnte das in Kapitel 5.2.2.2 beschriebene Aggregationsverhalten von succinylierten-PLL-Bürsten in humanem Serum sein, welches demnach nicht durch die Konjugation eines Antikörpers unterdrückt werden kann. Somit scheinen auch die Konjugate im Zellmedium, welches 5% fötales Kälberserum enthält, zu aggregieren und bleiben demzufolge an der Zellmembran haften. Überraschenderweise ist kein freier Antikörper in den Zellen zu erkennen, was wiederum den aus der FCS erhaltenen Ergebnissen widerspricht.



**Abbildung 5-36:** CLSM Aufnahmen von 37%-Succ-PLL-B-aDEC205 in BMDCs, 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nucleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer (37%-Succ-PLL-B-AF488); gelb-orange: Kolokalisation (37%-Succ-PLL-B-AF488-aDEC205-AF647).

Da die Anbindung des Antikörpers aDEC205 in Folge der Succinylierung schwierig, nicht eindeutig sowie nicht reproduzierbar ist und zudem die Aggregation nicht verhindert werden kann, wird im Verlauf der weiteren Arbeit mit diesem System nicht mehr weitergearbeitet.

#### 5.4.2 Poly(2-oxazolin)bürste-aDEC205

Aufgrund der in Kapitel 5.2.4 gezeigten Biokompatibilität der  $N_3$ -PEtOx-Bürsten und der  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-Bürsten wird im folgenden Abschnitt die Konjugation des Antikörpers aDEC205 an diese Polymerbürsten beschrieben.

##### 5.4.2.1 Synthese

In Abbildung 5-37 ist das Syntheschema zur Konjugation von aDEC205 an die Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten am Beispiel der  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-Bürsten gezeigt. Wie in Kapitel 7.5.5 beschrieben, wird auch hier im ersten Schritt der Antikörper aDEC205 mit dem heterobifunktionellen Linker DIBO-NHS umgesetzt. Im Anschluss kann die Azid-funktionalisierte Poly(2-oxazolin)bürste, ohne weitere Modifikation, über kupferfreie 1-3 Cycloaddition mit dem Dibenzocyclooctin reagieren. Der nicht reagierte Antikörper wird mittels „PALL Nanosep Devices 300 kDa“ abgetrennt.

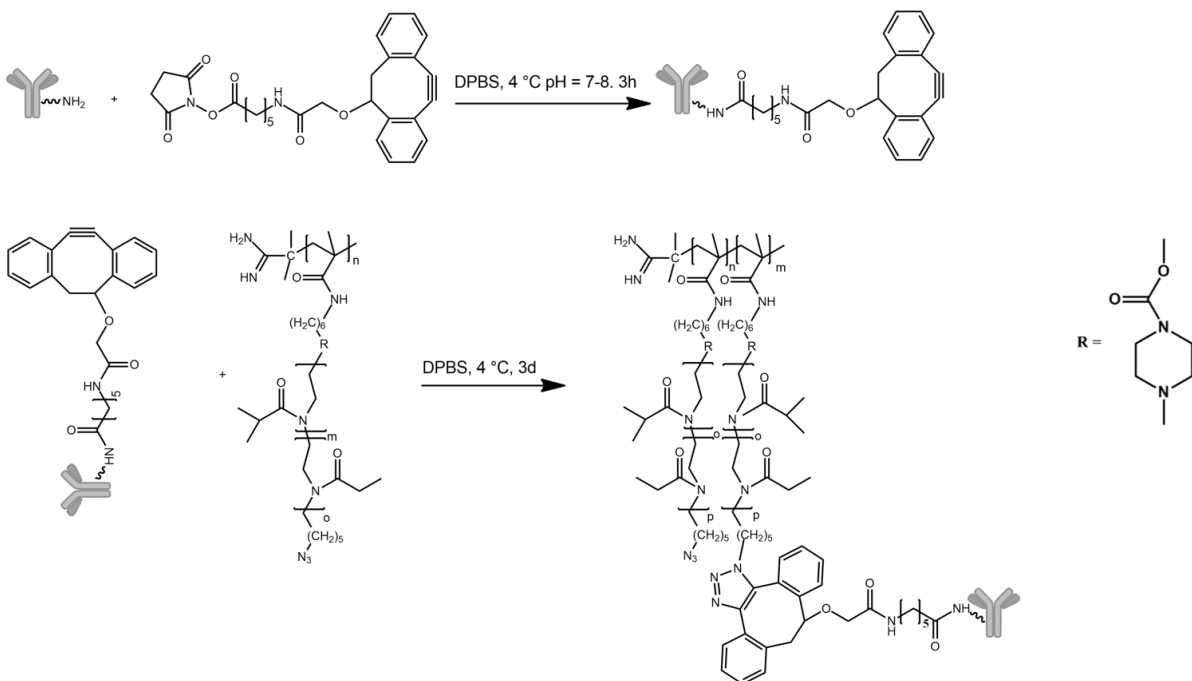


Abbildung 5-37: Reaktionsschema zur Konjugation von aDEC205 an die  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

### 5.4.2.2 Charakterisierung

Mittels UV-VIS Spektroskopie wird die Anzahl der konjugierten Antikörper pro Polymerbürste ermittelt. Es werden die in Tabelle 5-16 gezeigten Konjugate erhalten. In Abbildung 5-38 ist das UV-VIS Spektrum exemplarisch für das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-iPrOx-aDEC205-III Konjugat gezeigt.

Tabelle 5-16: Poly(2-oxazolin)bürsten-Antikörper-Konjugate

Probe	Polymer	Antikörper
N <sub>3</sub> -PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647-I	1	3
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CRh110-aDEC205-AF647-II	1	3
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CRh110-aDEC205-AF647-III	1	10
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647-IV	1	5
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647-V	1	10

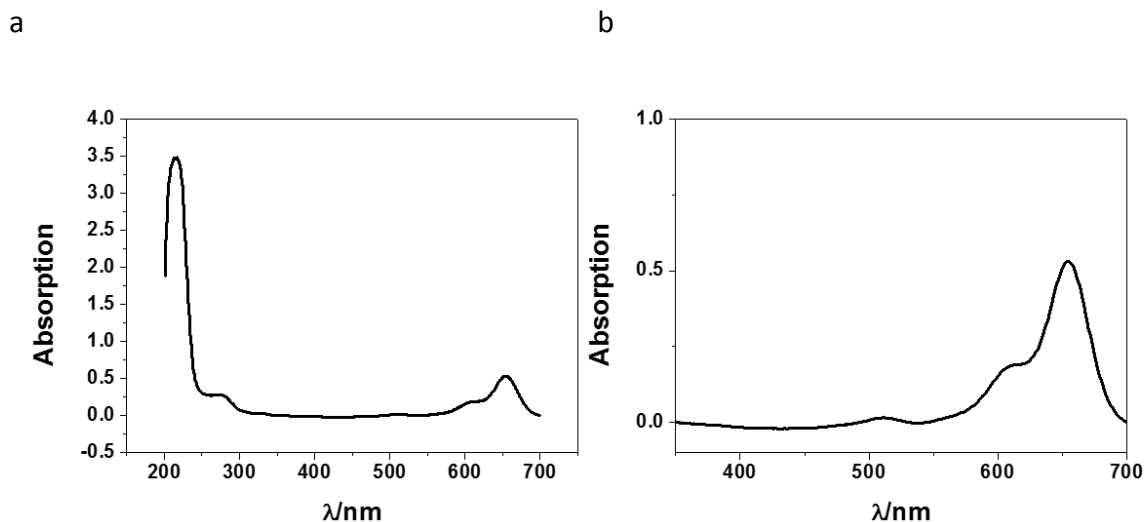
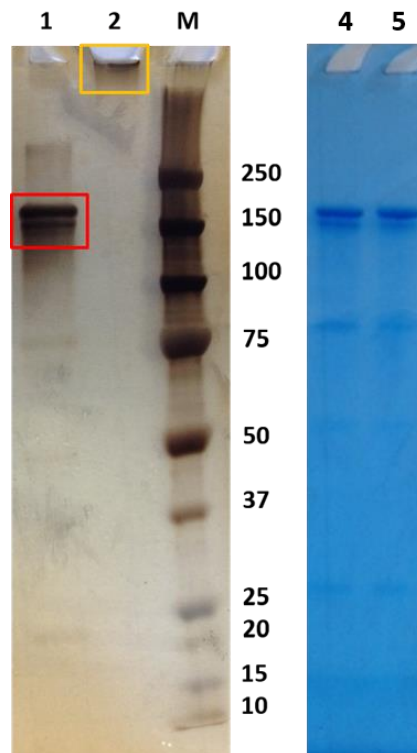


Abbildung 5-38: (a) UV-VIS Spektrum von N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-CRh110-aDEC205-AF647-III; (b) vergrößerter Abschnitt aus (a)

Zudem werden die Konjugate mittel SDS-Gelelektrophorese unter nichtreduzierenden Bedingungen untersucht (Abbildung 5-39). In Spur 1 und 4 ist der freie Antikörper aDEC205 aufgetragen. Dieser zeigt wie erwartet eine breite Bande bei 150 kDa. Das Konjugat ist in der Tasche von Spur 2 zu sehen, es wird kein freier Antikörper detektiert. Die sichtbare Bande in der Tasche von Spur 2 sowie das Verschwinden der Bande bei 150 kDa könnte auch eine

Folge von auftretender Aggregation des Antikörpers nach DIBO-Modifizierung sein. Um dies auszuschließen wird in Tasche 5 der mit DIBO-modifizierte Antikörper aDEC205 aufgetragen. Auch hier ist lediglich eine Bande bei 150 kDa erkennbar. Somit kann tatsächlich von einer erfolgreichen Konjugation von aDEC205 an die Poly(2-oxazolin)bürste ausgegangen werden.



**Abbildung 5-39: 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (nichtreduzierende Bedingungen); Tasche 1: aDEC205-AF647, 300 ng; Tasche 2: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647 Konjugat, 300 ng; Tasche M: Marker ALL Blue (Biorad); 300 ng; Tasche 4: aDEC205, 1µg; Tasche 5: aDEC205-DIBO; 1µg.**

Die Gelpermeationschromatogramme für aDEC205 (schwarz) und für das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat (rot) bei gleicher aDEC205 Konzentration sind in Abbildung 5-40 gezeigt. Aufgrund von starken Wechselwirkungen der Poly(2-oxazolin)bürste mit dem Säulenmaterial kann das Konjugat von der Säule nicht eluieren. Da für das Konjugat jedoch auch kein Elutionsprofil im Bereich des freien Antikörpers zu sehen ist, kann erneut davon ausgegangen werden, dass kein freier Antikörper aDEC205 mehr vorliegt. Dies bestätigt das aus der SDS-Gelelektrophorese erhaltene Ergebnis.

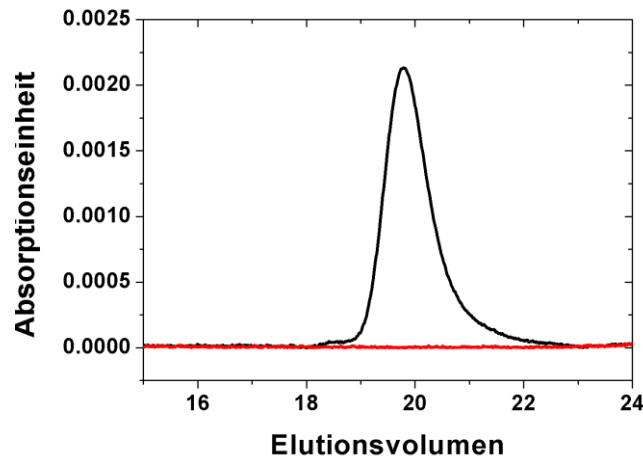


Abbildung 5-40: GPC von --- aDEC205-AF647 und --- N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647; mit einer aDEC205-Konzentration in beiden Proben von  $c = 0.2$  g/L; SHODEX OH-Pak, 3 Säulen mit Vorsäule (SB 802.5 HQ 6  $\mu\text{m}$ , 803 6  $\mu\text{m}$ , 804 10  $\mu\text{m}$ ), Säulenmaße: 8 x 300 mm, Säulenmaterial: Polyhydroxymetharylate, 0,5 ml/min, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,04,  $\lambda = 260$  nm; T = 293 K.

Zur weiteren Charakterisierung werden die Konjugate mittels FCS untersucht (in Zusammenarbeit mit [REDACTED], MPIP). Abbildung 5-41 stellt die AKF des freien Antikörpers aDEC205 und die AKF des N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugats bei einer Anregung mit  $\lambda = 633$  nm dar. Die AKF des Konjugats (blau) ist im Vergleich zur AKF des freien Antikörpers (schwarz) zu deutlich größeren Diffusionszeiten verschoben. Für den Antikörper wird ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 5$  nm und für das Konjugat von  $R_h = 38$  nm erhalten.

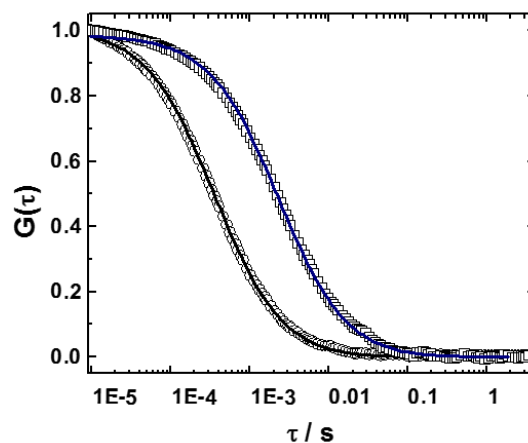
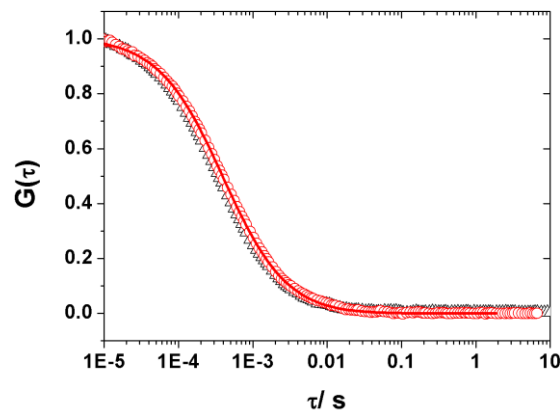


Abbildung 5-41: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen o --- aDEC205-AF647 und □ --- N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 633$  nm, T= 295.15 K.

Um sicherzustellen, dass die Antikörper tatsächlich kovalent an der Polymerbürste gebunden sind und nicht durch Physisorption an der Polymerbürste anhaften wird zur Kontrolle ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierzu wird nichtfunktionalisierter Antikörper aDEC205 zur N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste gegeben, über Nacht inkubiert und mittels FCS bei  $\lambda = 633$  nm vermessen. Es wird lediglich die in Abbildung 5-42 gezeigte Korrelation, welche dem freien Antikörper entspricht, erhalten. Dadurch wird bestätigt, dass der Antikörper nicht über Physisorption an der Polymerbürste anhaften kann.



**Abbildung 5-42: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- aDEC205-AF647 und --- N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488 + aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 633$  nm, T= 295.15 K.**

Eine weitere Methode um zu überprüfen, ob es sich bei der Probe um ein Polymer-Antikörper Konjugat handelt, das heißt in diesem Fall, dass jeweils zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Komponenten in einem Molekül vorliegen stellt die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) dar.

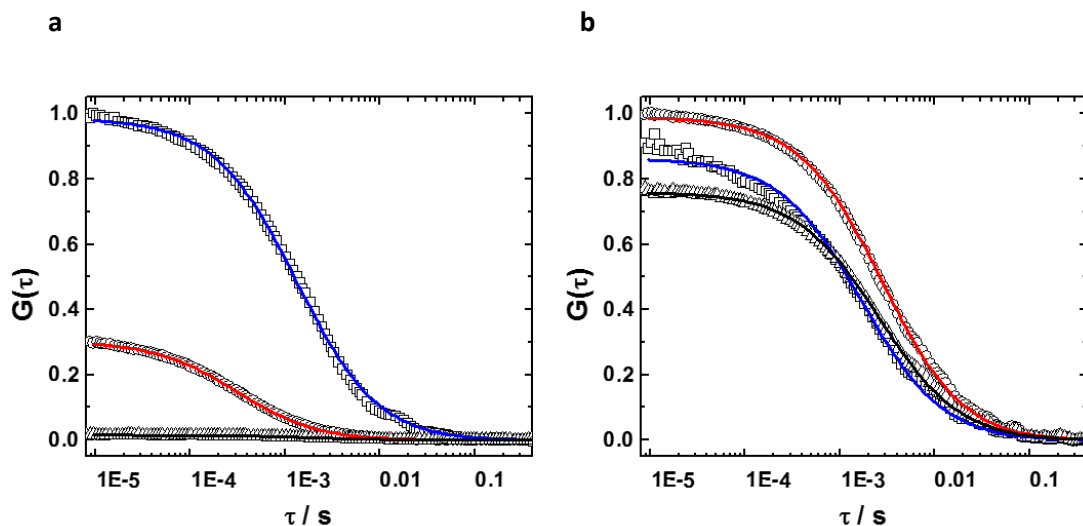
In Abbildung 5-43 sind zur Veranschaulichung die auf die größte Amplitude normalisierten Korrelationskurven und deren Fits für die Kontrollprobe N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx + aDEC205 (a) sowie das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat (b) gezeigt. In Folge von zusätzlicher Desaktivierung durch Tripletübergänge und in geringer Konzentration frei vorliegendem Farbstoff kommt es für kleine Relaxationszeiten zu Abweichungen des Fits. Die Abweichung des Fits für große Relaxationszeiten wird durch die Polydispersität des Polymers bzw. des Polymer-Antikörper Konjugats verursacht. Allgemein werden aufgrund von unterschiedlich großen Detektionsvolumina des roten und des blauen Kanals unterschiedlich große Amplituden  $G(\tau)$  erhalten. Das Detektionsvolumen bei  $\lambda = 488$  nm ist durch die Wellenlängenabhängigkeit der Beugungsbegrenzung kleiner als bei  $\lambda = 633$  nm.

Weiterhin gilt:

$$G(\tau) \sim \frac{1}{N} \quad (\text{Gl. 5-7})$$

mit  $N$  = Anzahl detektierter Teilchen im konfokalen Volumen.

Unter der Voraussetzung, dass alle Teilchen beide Farbstoff tragen und die Konzentration der markierten Teilchen gleich ist, halten sich im kleineren Detektionsvolumen (blauer Kanal) weniger Teilchen auf, woraus sich eine größere Amplitude  $G(\tau)$  für den blauen Kanal im Vergleich zum roten Kanal ergibt. Für das  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat (Abbildung 5-43-b) wird jedoch im roten Kanal eine etwas höhere Amplitude im Vergleich zum blauen Kanal erhalten. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration an blaumarkierter Spezies (Polymer) höher ist und somit neben dem Polymer-Antikörper Konjugat noch geringe Mengen an freiem Polymer vorliegen. (Vgl. Konzentrationen in Tabelle 5-17). Die Amplitude  $G(0)$  der Kreuzkorrelation ist proportional zur Anzahl der doppelt markierten Moleküle im Kreuzkorrelationsvolumen und zeigt für das Konjugat im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der die Amplitude  $G(0) = 0$  beträgt, einen signifikant höheren Wert. Dies spricht dafür, dass ein Großteil der beobachteten Moleküle doppelt markiert ist.



**Abbildung 5-43:** FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen: (a) Negativkontrolle: --- Blauer Kanal  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488; --- Roter Kanal aDEC205-AF647 und Kreuzkorrelation --- Mischung  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488 und unmodifizierter aDEC205; (b) --- Blauer Kanal ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488AF +  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205 Konjugat); --- Roter Kanal (aDEC205-AF647 +  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647 Konjugat) und Kreuzkorrelation ---  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647 Konjugat; in 1X PBS, T= 295.15 K.



Im Folgenden werden die Diffusionskoeffizienten und die daraus resultierenden hydrodynamischen Radien sowie die Konzentrationen der jeweiligen fluoreszenzmarkierten Proben, die man aus den Fits der nicht normalisierten AKF (hier nicht gezeigt) erhält, betrachtet (Tabelle 4-1). Für den roten Kanal wird ein dem Konjugat zuzuordnender hydrodynamischer Radius von  $R_h = 42,5$  nm erhalten. Der aus dem blauen Kanal erhaltene kleinere hydrodynamische Radius von  $R_h = 33,8$  nm ist auch hier wieder durch die womöglich auftretende Triplet-Relaxation der Farbstoffe bei kleinen Korrelationszeiten zu erklären.

**Tabelle 5-17: Nach FCS ermittelte hydrodynamische Radien**

Kanal	N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647-IV		Negativkontrolle	
	Rh/nm	c/ nM	Rh/nm	c/nM
<b>Rot (633 nm)</b>	42.5 ± 0.96	0.09 ± 0.002	4.86 ± 0.11	1.96 ± 0.042
<b>Blau (488 nm)</b>	33.8 ± 0.94	0.13 ± 0.004	26.5 ± 0.60	0.73 ± 0.024
<b>Kreuzkorrelation</b>	44.6 ± 0.74	0.08 ± 0.004	-	-0.02 ± -0.001

### 5.4.2.3 Aggregation in humanem Serum

Abbildung 5-44 zeigt die mittels der DLS ermittelten Autokorrelationsfunktion und den Multikomponentenfit für die Mischung aus dem Polymerbürsten-Antikörper Konjugat ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205) und humanem Serum. Die Funktion lässt sich gut durch die Fitfunktion beschreiben. Somit kann eine Aggregation, wie schon zuvor für das reine Polymer gezeigt, in humanem Serum ausgeschlossen werden.

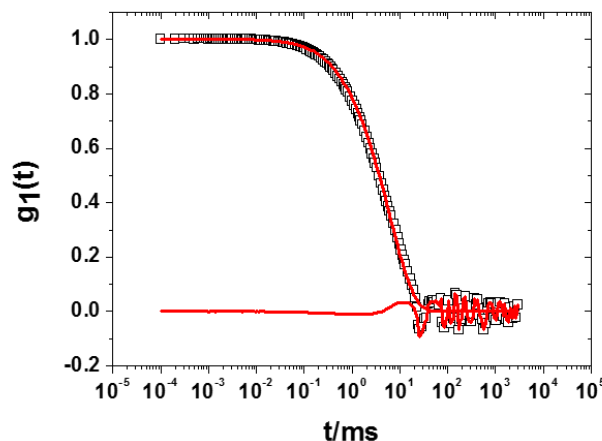


Abbildung 5-44: □ AKF von Poly- $N_3$ -EtOx-b-iPrOx-aDEC205 in Serum; --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c = 0.05$  g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8$  nm;  $T = 293$  K.

### 5.4.2.4 Charakterisierung der Konjugate *in vitro*

In Zusammenarbeit mit [REDACTED] (Institut für Dermatologie, Universitätsmedizin Mainz) wird die Aufnahme der Konjugate in BMDCs nach 4 h Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$  mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abbildung 5-45 sind die entsprechenden Dotplots gezeigt. Hierbei entspricht die y-Achse entweder dem AlexaFluor488 Kanal (Polymer) oder dem APC-Kanal<sup>3</sup> (aDEC205). Die x-Achse zeigt die nicht-dendritischen (CD11c-) sowie dendritischen Zellen (CD11c+). Die Bereiche über dem horizontalen Trennstrich Q1-1 und Q2-1 für aDEC205 sowie Q1-3 und Q2-3 für das Polymer geben Auskunft über die Zahl der Zellen, die den Antikörper aDEC205 bzw. das Polymer tragen. Diese Trennlinien werden anhand von Negativkontrollen, bei denen keine Probe auf die Zellen gegeben wird, erhalten (Abbildung 5-45-a und c). Die Abbildung 5-45-b und d zeigen die Dotplots des Konjugats. Die Bereiche Q-2-1 und Q2-3 in (b) und (d) zeigen für das Polymer-aDEC205 Konjugat eine

<sup>3</sup> Kanal zur Detektion des Farbstoffs AlexaFluor647

Aufnahme von 25,2 % (488-Polymerkanal) sowie 25,5 % (APC-DEC205-Kanal) in positiven dendritischen Zellen. Um sicherzustellen, dass es sich bei der Aufnahme tatsächlich um das Konjugat handelt und nicht um die einzelnen Komponenten, werden die Zellen, welche aDEC205 aufgenommen haben blau markiert. Diese Markierung wird bei der Auswertung des 488-Polymerkanals beibehalten. Somit zeigen nahezu alle Zellen, welche das Polymer aufgenommen haben auch gleichzeitig eine Aufnahme des Antikörpers aDEC205.

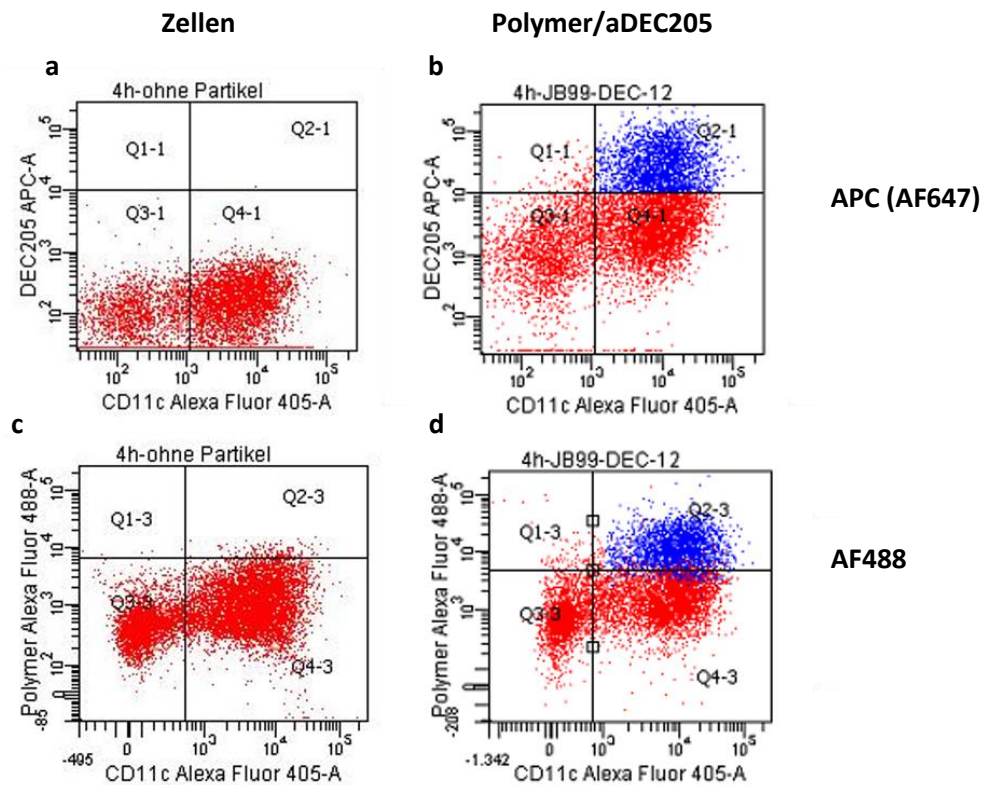
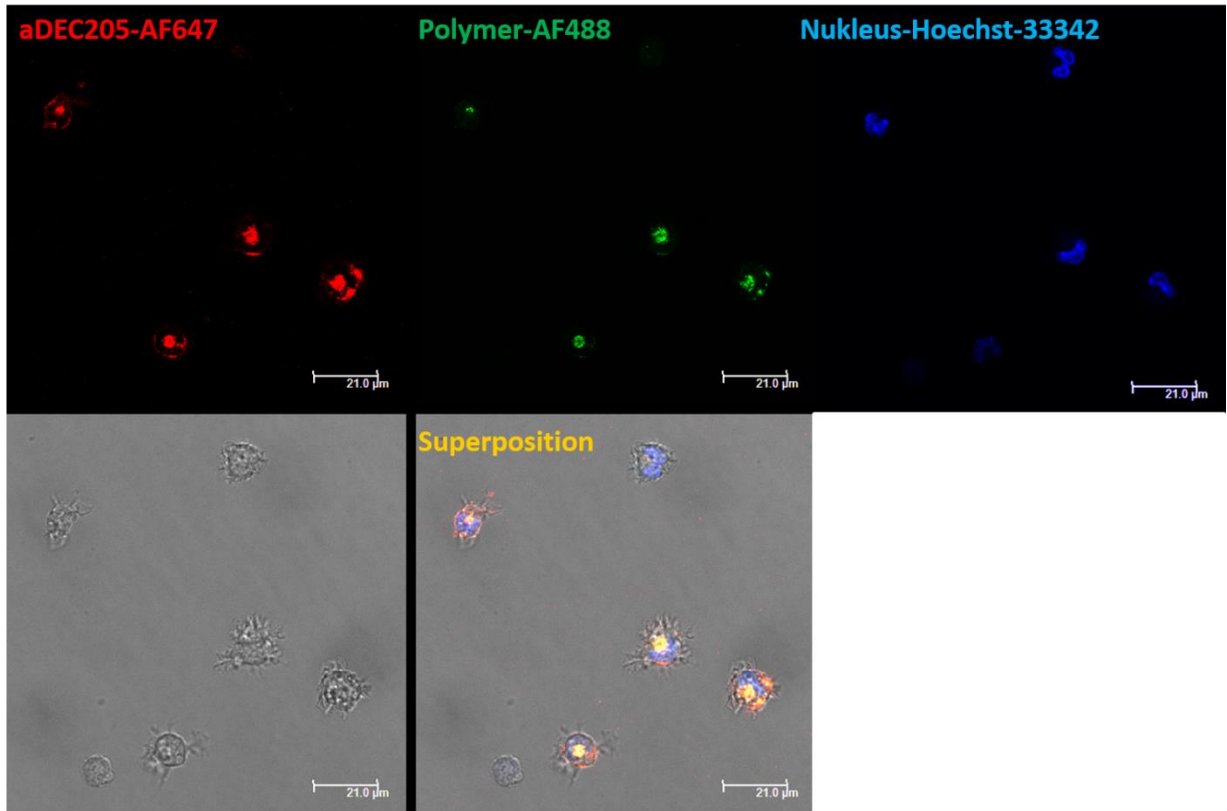


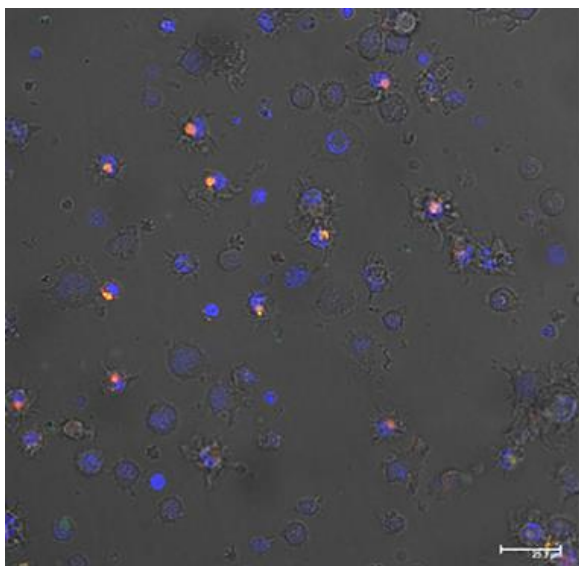
Abbildung 5-45: FACS-Messung; links: Zellen ohne Partikel; rechts: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647; (a) und (b) APC-Kanal (AlexaFluor647); (c) und (d) AlexaFluor488 Kanal; blau = DCs, welche aDEC205 gebunden/aufgenommen haben.

Auch in den CLSM-Aufnahmen nach 4h (Abbildung 5-46) wird eine gleichzeitige Aufnahme des Antikörpers aDEC205 und der Polymerbürste in BMDCs, anhand der Superposition beider Farbstoffe, beobachtet.

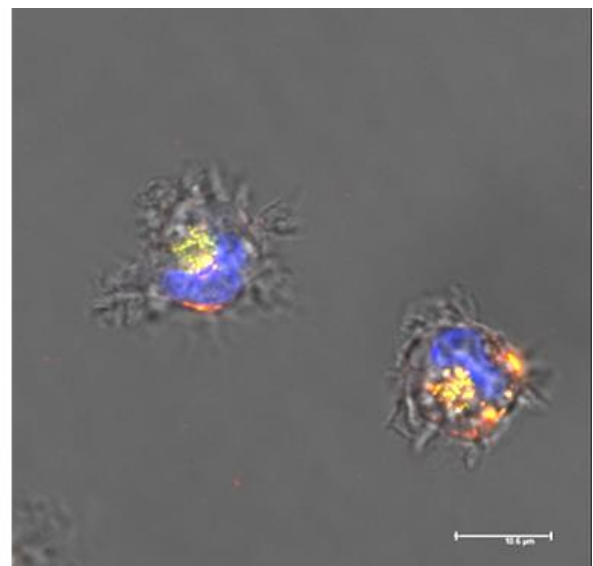
**a**



**b**



**c**



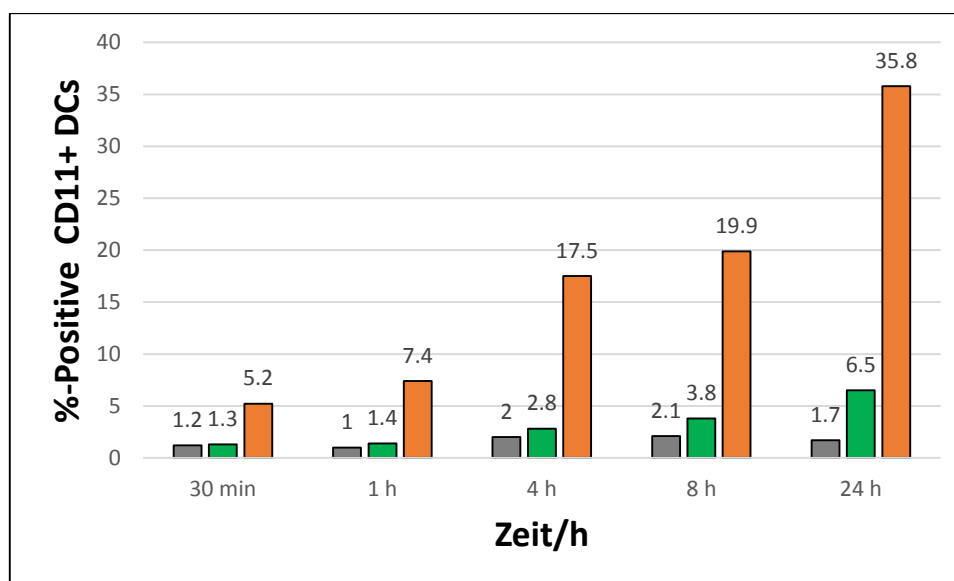
**Abbildung 5-46:** CLSM Aufnahmen an BMDCs: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nucleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx); gelb-orange: Kokoloration ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205); Maßstabballen: (a) 21 µm; (b) 25.3 µm und (c) 10.6 µm.

Da das Polymer alleine keine unspezifische Aufnahme zeigt (siehe Kapitel 5.2.4.2) und XXXXXXXXXX, nach Inkubation der Einzelkomponenten (aDEC205-AF647 und Polymer-AF488) mit den Zellen keine Kolo-kalisation zeigen konnte<sup>[8]</sup>, ist dieses Ergebnis ein weiterer Beweis für die erfolgreiche Konjugation des Antikörpers aDEC205 an die Poly(2-oxazolin)-bürste.

Des Weiteren wird die Zellaufnahme nach unterschiedlichen Inkubationszeiten für die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste sowie für das entsprechende aDEC205-Polymerbürsten Konjugat mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 5-47). Hierzu werden die Proben bis zu 24 h mit den BMDCs bei 37 °C inkubiert. Im Zeitraum zwischen 30 min und 8 h ist für das Polymer, unter Berücksichtigung der Untergrundfluoreszenz der Zellen ohne Partikel, kaum eine Aufnahme in die Zellen erkennbar. Erst nach 24 h wird eine erhöhte Internalisierung von 6.5% detektiert. Die Ursache für diese erhöhte Zellaufnahme liegt in der Natur unreifer DCs bzw. noch nicht vollständig ausgereifter DCs begründet. So beträgt der Reifegrad nach 8h lediglich 31% bzw. nach 24h circa 38%. Dahingegen wird im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt, dass durch Zugabe eines Stimuli (LPS) der Reifegrad auf circa 62% ansteigt (Abbildung 5-50). Demnach kann für das hier beschriebene Experiment von unreifen bzw. nicht vollständig ausgereiften DCs ausgegangen werden. Unreife DCs sind darauf spezialisiert konstant Proben/Antigene mittels drei unabhängiger Endozytosemechanismen (unspezifische Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose und Phagozytose) aus ihrer Umgebung aufzunehmen.<sup>[160]</sup>

Im Gegensatz zum Polymer zeigt das Konjugat mit zunehmender Zeit eine deutlich verstärkte Internalisierung in BMDCs. Nach 4 h wird eine Aufnahme von 17,5 % erhalten, diese verdoppelt sich nach 24 h auf 35,8 %. Mahnke et al. konnten zeigen, dass der DEC205 Rezeptor nach Proben/Antigenaufnahme und anschließender Abgabe des Materials in die Zelle wieder an der Zelloberfläche zur weiteren Proben/Antigenaufnahme regeneriert wird.<sup>[161]</sup> Demzufolge werden Antigene, die an den Antikörper aDEC205 konjugiert werden, sehr effizient von DCs mittels Endozytose aufgenommen und gegebenenfalls prozessiert und präsentiert.<sup>[81]</sup>

Weitere Untersuchungen zu Internalisierungskinetiken werden in Kapitel 5.4.3 gezeigt.



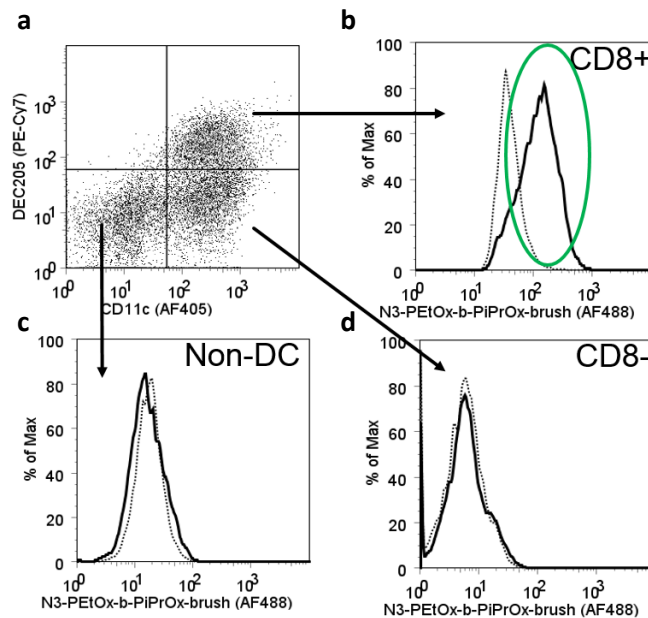
**Abbildung 5-47: Bindungs-/Aufnahmekinetik an/in BMDCs: ● Zellen ohne Partikel; ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx und ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat; Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit: 30 min - 24h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen.**

In den obigen FACS-Messungen wird noch nicht zwischen den beiden Subpopulationen CD8+ DCs und CD8- DCs unterschieden. Diese Unterscheidung ist jedoch mit Hinblick auf spätere Versuche zur CD8+ T-Zell Proliferation sehr wichtig. Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, weisen insbesondere die CD8+ DCs, welche den C-Typ Lektin Rezeptor DEC205 co-exprimieren, die Fähigkeit zur CD8+ T-Zell Kreuzpräsentation auf.<sup>[148]</sup>

Mittels Durchflusszytometrie wird gezeigt, dass 29% der CD11c+ BMDCs den DEC205-Rezeptor co-exprimieren und demnach als CD8+ BMDCs angesehen werden können. Hierbei ist zu beachten, dass die Zahl der DEC205+ (CD8+) BMDCs in der Regel zwischen 25%-35% schwankt. Hingegen tragen 33 % der CD11c+ BMDCs keinen DEC205-Rezeptor auf der Zelloberfläche und 37 % der Zellen sind CD11c negativ (Abbildung 5-48-a).

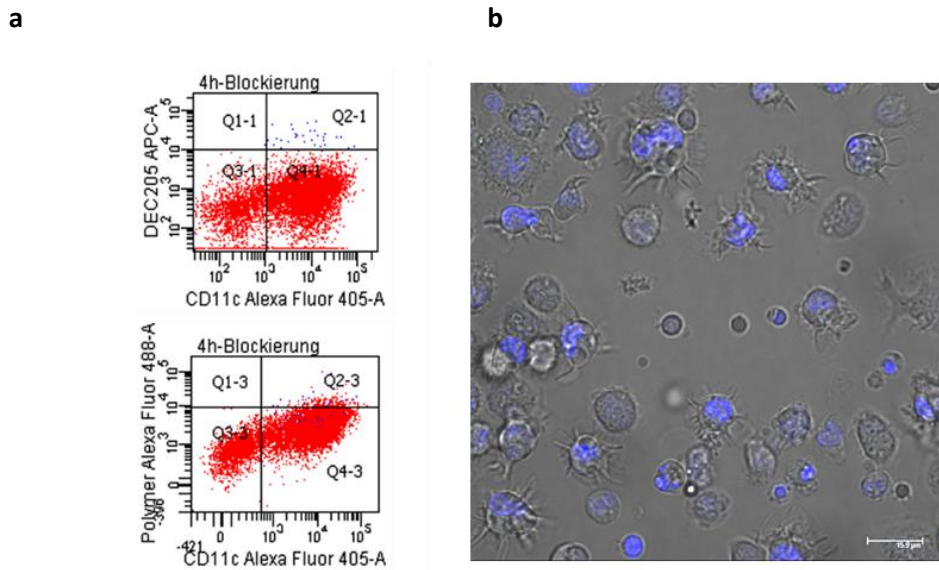
Nach vierstündiger Inkubation der reinen Polymerbürste (N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste) (gestrichelte Linie) mit den BMDCs werden für die CD11c+ (b,d) sowie für die CD11c- (c) Zellpopulationen niedrige mittlere Fluoreszenzsignale (MFI) erhalten und demzufolge keine Zellanbindung bzw. Zellaufnahme beobachtet. Im Gegensatz dazu wird nach Inkubation des Polymer-Antikörper Konjugats (N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-aDEC205) (durchgezogene Linie) ein um den Faktor drei erhöhtes mittleres Fluoreszenzsignal für DEC205+CD11c+ BMDCs (Abbildung 5-48-b) und somit eine Zellanbindung bzw. Zellaufnahme beobachtet. DEC205-CD11c+ BMDCs sowie CD11c negative Zellen zeigen auch für das Polymer-Antikörper

Konjugat wie schon für das Polymer alleine keine Zellanbindung bzw. Zellaufnahme (Abbildung 5-48-c und d).



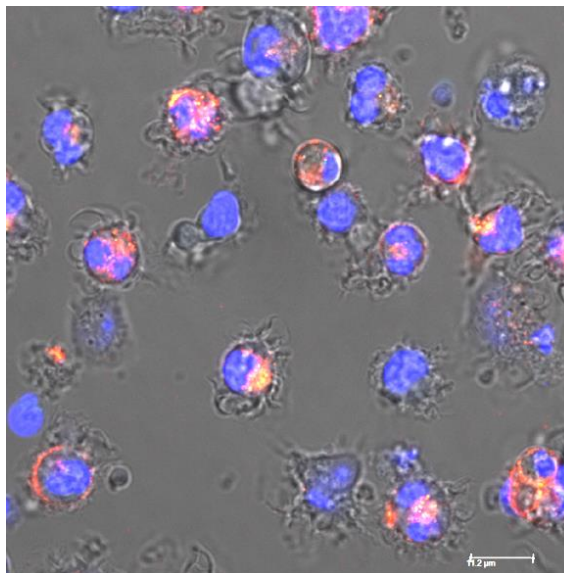
**Abbildung 5-48: FACS Messung: Bindung von --- unkonjugiertem Polymer (N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx) und von --- N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx- aDEC205 Konjugat an verschiedene Zellpopulationen; Inkubationszeit 4h, Konzentration: 1\*10<sup>12</sup> Partikel/5\*10<sup>5</sup> Zellen.**

Dieses Ergebnis deutet sehr auf eine DEC205-rezeptorvermittelte Aufnahme in DEC205+CD11c+ (CD8+) BMDCs hin. Zur Stützung dieser Annahme wird ein Blockierungsexperiment durchgeführt. Hierzu werden BMDCs vor der Zugabe des Polymer-Antikörper Konjugats mit einem großen Überschuss an nichtmarkiertem nativem Antikörper aDEC205 vorinkubiert. Die FACS Messung zeigt eine Bindung bzw. Aufnahme des Konjugats von nur circa einem Prozent in BMDCs (Abbildung 5-49-a; Q2-1 und Q2-3). In der CLSM-Aufnahme ist ebenfalls keine Aufnahme des Konjugats in BMDCs zu sehen. Somit kann eine unspezifische Aufnahme ausgeschlossen und demzufolge von einer DEC205-Rezeptorvermittelten Aufnahme in BMDCs ausgegangen werden.



**Abbildung 5-49:** Zellaufnahme von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat in BMDCs nach Vorinkubation mit aDEC205: (a) FACS-Messung und (b) CLSM Aufnahme; Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647 (hier nicht zu sehen); grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488), (hier nicht zu sehen); gelb-orange: Kolo-kalisation ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647), (hier nicht zu sehen).

Einen weiteren Hinweis auf eine DEC205-Rezeptorvermittelte Zellaufnahme liefern die CLSM- Aufnahmen zur Internalisierung des Konjugats in ausgereifte BMDCs (Reifegrad 62%). Die Ausreifung der BMDCs wird durch vorherige Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) induziert (Abbildung 5-50).<sup>[162]</sup>



**Abbildung 5-50:** Zellaufnahme von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat in BMDCs nach Vorinkubation mit LPS, Reifegrad der Zellen : 62 %; CLSM Aufnahme; Zellen in 1X PBS, Reifegrad (CD86: 62%) nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488); gelb-orange: Kolo-kalisation – Polymerkonjugat ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647).



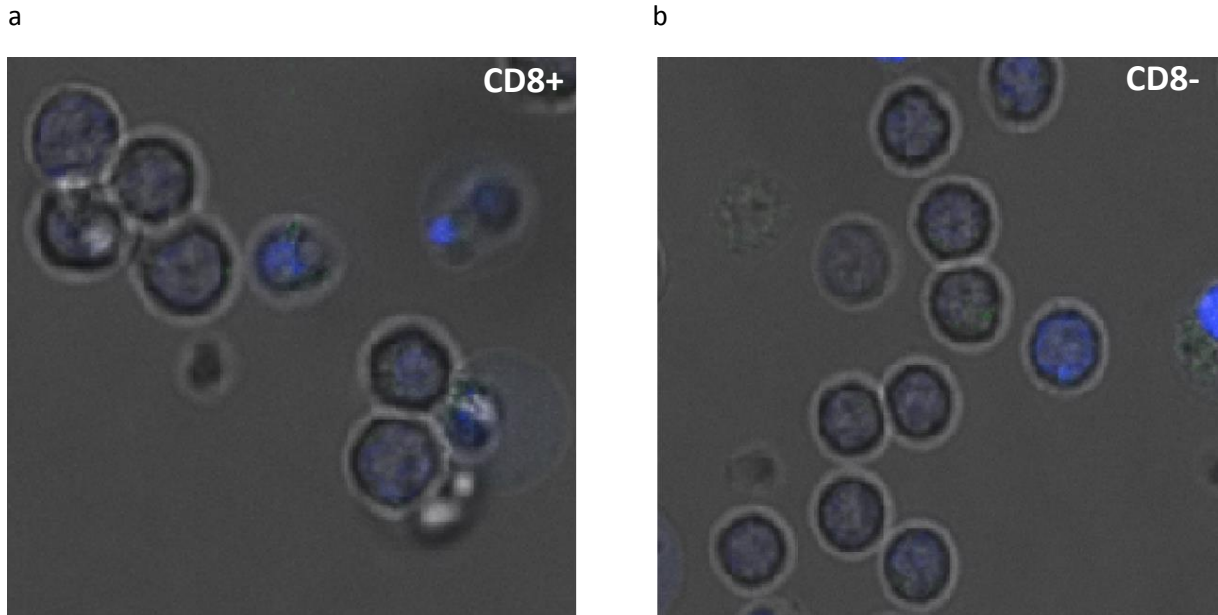
Wie bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde lange Zeit angenommen, dass reife dendritische Zellen (mDCs) alle Mechanismen der Endozytose herunterregulieren und somit kein weiteres Material von den Zellen aufgenommen wird. Hingegen können unreife dendritische Zellen (iDCs) mit Hilfe verschiedener Mechanismen, beispielweise unspezifisch durch Makropinozytose oder spezifisch durch rezeptorvermittelte Endozytose Material aufnehmen.<sup>[65]</sup>

Aus aktuellerer Literatur ist jedoch bekannt, dass nach Ausreifung lediglich die unspezifische Zellaufnahme (Makropinozytose, Phagozytose) herunterreguliert wird.<sup>[163, 164]</sup> Darüber hinaus zeigen Platt et al., dass reife DCs weiterhin Antigene über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufnehmen, prozessieren und im Anschluss über die MHCI/MHCII Moleküle den CD8+/CD4+ T-Zellen präsentieren.<sup>[64]</sup>

Die hier vorgestellten Polymer-Antikörper-Konjugate scheinen wohl über ihre hoch spezifische Wechselwirkung mit dem DEC205 Rezeptor mittels solcher Aufnahmewege auch von ausgereiften DCs aufgenommen zu werden.

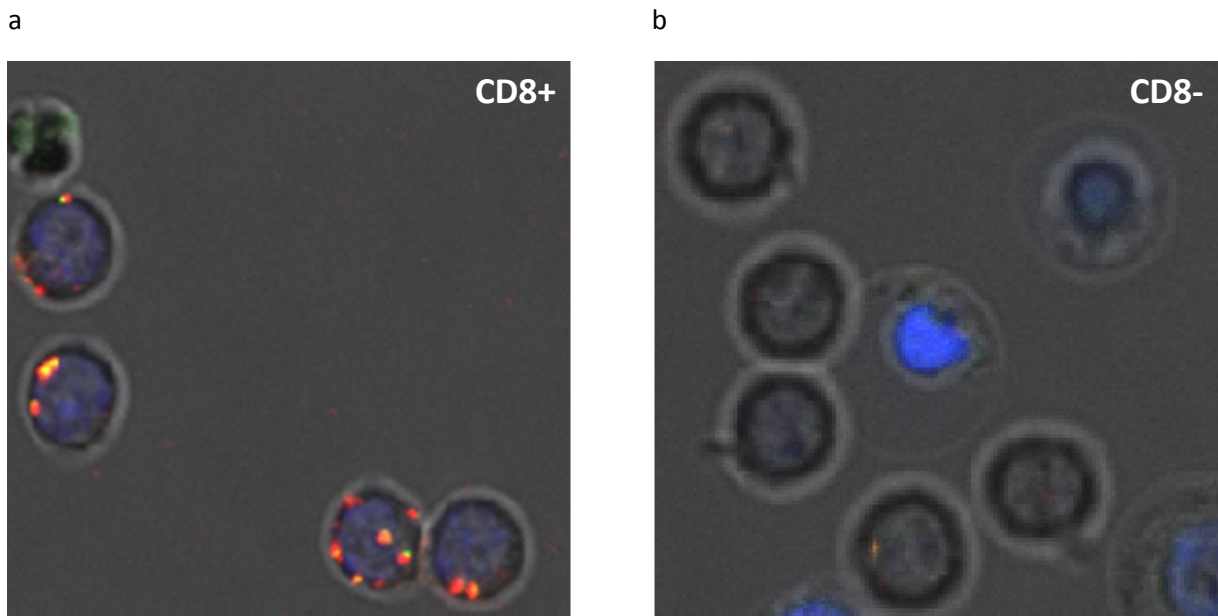
### 5.4.2.5 Zellaufnahme in Milz-DCs

Im Hinblick auf spätere *in vivo* Versuche wird die Zellaufnahme an dendritischen Zellen der Milz (Milz-DC) untersucht. In Abbildung 5-51 sind die CLSM-Bilder der nach immunomagnetischer Aufreinigung (MACS) erhaltenen CD8+ Milz-DCs (a) sowie der CD8- Milz-DCs (b) nach 24-stündiger Inkubation mit der Polymerbürste (N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx) gezeigt. Wie schon für die BMDCs zeigt das Polymer alleine keine unspezifische Zellaufnahme in Milz-DC.



**Abbildung 5-51: CLSM Aufnahmen an Milz-DCs (a) CD8+ und (b) CD8-: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 24h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488) (hier nicht zu sehen).**

Demgegenüber wird für das Polymer-Antikörper Konjugat ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205) eine Superposition beider Fluoreszenzfarbstoffe in der CD8+ DC-Subpopulation erhalten. Die CD8- DCs (Abbildung 5-52-b) zeigen keine Aufnahme. Somit wird das Konjugat spezifisch von den CD8+ DCs aufgenommen (Abbildung 5-52-a).



**Abbildung 5-52: CLSM Aufnahmen an Milz-DCs (a) CD8+ und (b) CD8-: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 24h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488); gelb-orange: Kolokalisationskonjugat ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-aDEC205-AF647).**

#### 5.4.2.6 Zusammenfassung

Die Konjugation des Antikörpers aDEC205 an PLL, an 37%-succinyliertes PLL und an die 37%-succinylierte PLL-Bürste war schwierig, nicht eindeutig und zudem nicht reproduzierbar. Mit Hilfe der FCS wurden große Mengen an freiem Antikörper aDEC205 detektiert. Die Zellaufnahmestudien zeigten für das 37%-succinylierte PLL-Bürsten-aDEC205 Konjugat eine Anlagerung an die Zellmembran. Dies ist vermutlich eine Folge der möglichen Aggregation in dem Zellmedium (enthält fötales Serum), welche somit nach Anbindung des Antikörpers aDEC205 nicht verhindert werden kann. In Folge dieser Ergebnisse wurde sich dazu entschieden mit diesen Systemen nicht weiterzuarbeiten.

Die Anbindung des Antikörpers aDEC205 über kupferfreie Click-Chemie an die Poly(2-oxazolin)bürste wurde zweifelsfrei mit Hilfe mehrerer analytischer Methoden bewiesen. Mittels GPC, SDS-PAGE und FCS wurde kein freier aDEC205 Antikörper detektiert. Zudem zeigte die FCS für das Konjugat eine Kreuzkorrelation, welche das Vorhandensein einer chemischen Bindung zwischen aDEC205 und Polymerbürste bestätigt. Für das Konjugat wurde ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 38$  nm ermittelt. Auch nach Anbindung des Antikörpers aDEC205 wurde keine Aggregation in humanem Blutserum detektiert.

Innerhalb der *in vitro* Versuche, FACS und CLSM, wurde eine eindeutige Aufnahme in CD8+ CD11+ DCs erhalten, wohingegen die CD8- CD11+ DCs und die CD11- Zellen keine Aufnahme des Konjugats zeigten. Die CLSM Aufnahmen bestätigen die Zellaufnahme und zeigten eine Kollokalisierung des Antikörpers aDEC205 und der Poly(2-oxazolin)bürste in der Zelle.

Eine Vorinkubation mit nativem aDEC205 führte zur Blockierung der Rezeptoren und zu keiner weiteren Aufnahme des Konjugats. Des Weiteren wurde nach Ausreifung der DCs und der damit verbundenen Herunterregulierung der unspezifischen Makropinozytose eine Aufnahme des Konjugats in die Zelle beobachtet, was erneut die DEC205-rezeptorvermittelte Zellaufnahme bestätigt.

Mit Hilfe einer Zellaufnahmekinetik wurde gezeigt, dass unreife DCs trotz ihrer Eigenschaft zur nichtspezifischen Makropinozytose nach 24 h lediglich 6.5 % der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste aufgenommen haben. Hingegen konnte nach Anbindung des Antikörpers aDEC205 eine Zellaufnahme von bis zu 35.8 % erhalten werden.

Für Milz-DCs wurde ebenso wie für BMDCs eine spezifische Zellaufnahme des Polymerbürsten-aDEC205 Konjugats in CD8+ CD11+ DCs gezeigt.

### 5.4.3 Internalisierungskinetik SHIP

#### 5.4.3.1 Internalisierungskinetik mit FIP als SHIP-Sensor

Um die Effizienz vieler Therapeutika (u.a. Krebsmedikamente und Impfstoffe) zu verbessern sind die Fähigkeit zur Quantifizierung sowie das Verständnis der Internalisierung von Wirkstoffträgern in die Zelle sehr wichtig.<sup>[139, 165]</sup> Wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, sollte das nichtfunktionalisierte polymere Trägersystem für ein effektives Antikörper-vermitteltes Zelltargeting keine unspezifische Aufnahme in Zellen zeigen. Im Folgenden wird hierzu die Internalisierung der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten, welche jeweils mit dem Antikörper aDEC205 (NLDC45) oder aCD11c (N418) funktionalisiert werden, mit Hilfe des in Kapitel 4.10 beschriebenen SHIP-Experiments<sup>[139]</sup> untersucht. Der Antikörper aCD11c (N418) zählt ebenso wie der Antikörper aDEC205 zur Klasse der Immunglobuline (IgG) und weist ein Molekulargewicht von 150 kDa auf. Im Gegensatz zum aDEC205, welcher spezifisch an CD8+ DCs bindet, zeichnet sich der Antikörper aCD11c durch seine hohe Bindung an alle CD11c+ DCs (das heißt sowohl CD8+ als auch CD8- DCs) aus. Unser Augenmerk liegt auf den CD8+ DCs, da diese Untergruppe, wie bereits in Kapitel 3.2.2 erläutert, zur Antigenaufnahme und anschließender CD8+ T-Zell Präsentation auf den MHC-I Molekülen befähigt sind (Kreuzpräsentation).<sup>[165, 166]</sup>

Die Synthese der verschiedenen Polymer-SHIP-Antikörper(aDEC205 bzw. aCD11c) Konjugate erfolgt ähnlich zur Synthese der Polymer-Antigen-Antikörper Konjugate (Vgl. Kapitel 5.4.5). Im ersten Schritt wird das Azid-funktionalisierte Polymer mittels kupferfreier Click-Chemie mit dem heterobifunktionellen Linker Dibenzocyclooctin-Maleimid (DBCO-MAL) funktionalisiert. Der zur gleichen Zeit mittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin) (TCEP) reduzierte SHIP Sensor FIPCy5 (siehe Abschnitt 4.10) reagiert nun über das am 3`- Ende frei vorliegende Thiol mit dem maleimidfunktionalisierten Polymer. Im Anschluss wird auch hier wie in Kapitel 5.4.5 gezeigt, der entsprechende Antikörper über kupferfreie Click-Chemie angebunden. Die Konjugationseffizienz wird mit Hilfe der UV-VIS Spektroskopie ermittelt.

**Tabelle 5-18: Poly(2-oxazolin)bürsten-FIP(SHIP)-Antikörper-Konjugate**

Probe	Polymer	FIP	Antikörper
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5	1	10	-
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aDEC205	1	10	8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aCD11c	1	10	8

Die in Tabelle 5-18 gezeigten Proben werden für 30 Minuten bei 4 °C mit den frisch isolierten murinen Milz-DCs bzw. mit den über Nacht unter Zugabe von LPS (Stimuli) ausgereiften murinen Milz DCs inkubiert. Bei 4 °C werden die Proben lediglich an der Zelloberfläche gebunden. Für die Internalisierungskinetik werden die Zellen von dem Überschuss an Probe durch einen anschließenden Waschschrift befreit und für bestimmte Zeitpunkte bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss an die Internalisierungskinetik findet die Phänotypisierung der Zellen bei 4 °C statt. Zur Identifikation der DC-Population wird ein BV510 markierter Antikörper anti-CD11c und für die CD8<sup>+</sup> Zellpopulation ein BV421 markierter Antikörper anti-CD8 verwendet. Um zu unterscheiden, ob die Probe von der Zelle aufgenommen wird oder sich lediglich an der Zelloberfläche befindet, wird die Hälfte der Zellen bei 4 °C mit dem spezifischen Quencher BHQ2 (siehe Abschnitt 4.10) (keinen Effekt auf die Fluoreszenz der Oberflächenmarker) versetzt.<sup>[139]</sup> Johnston et al. konnte zeigen, dass dieser Quencher bei 4 °C nicht von den Zellen aufgenommen wird und somit nur die Fluoreszenz auf der Zelloberfläche auslöscht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der SHIP Sensor alleine bei 4°C nicht an DCs bindet und somit nicht internalisiert wird.<sup>[8, 139]</sup>

In Abbildung 5-53 ist als erstes die spezifische Bindung an unreifen sowie reifen CD8<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> DCs für die in Tabelle 5-18 dargestellten Konjugate gezeigt. Ein qualitativer Vergleich der Bindung wird aus dem Fluoreszenzsignal nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C erhalten. Für das als Kontrolle dienende Polymer-FIP Konjugat wird eine leichte unspezifische Bindung an unreifen CD8<sup>+</sup> DCs (600 a.u.) beobachtet. Eine Ursache für diese unspezifische Bindung ist möglicherweise die negative Ladung der angehenden FIP-DNA (vgl. Kapitel 5.2.1.3). Da diese unspezifische Bindung im Vergleich zu den mit Antikörper verbundenen Konjugaten gering ausfällt und für reife DCs gar nicht auftritt wird sie erst einmal vernachlässigt.

Das Polymer-FIP-aDEC205 Konjugat zeigt für unreife DCs eine um einen Faktor 29 erhöhte spezifische Bindung an CD8<sup>+</sup> DCs (3160 a.u.) im Vergleich zu CD8<sup>-</sup> DCs (109 a.u.). Für reife DCs wird aufgrund der zunehmenden Expressierung des DEC205-Rezeptors auf CD8<sup>-</sup> DCs<sup>[167, 168]</sup> lediglich eine um Faktor 5 erhöhte Bindung an CD8<sup>+</sup> DCs (3195 a.u.) erhalten (CD8-DCs 666 a.u.).

Da der CD11c-Rezeptor (alpha x Transmembranprotein) als Universalmarker für dendritische Zellen gilt wird dieser sowohl auf den CD8<sup>+</sup> als auch auf den CD8<sup>-</sup> DCs sehr stark exprimiert. Somit zeigt das Polymer-FIP-aCD11c Konjugat für beide Subpopulationen eine starke Bindung, welche im Vergleich mit den aDEC205-Konjugaten viel höher ausfällt.

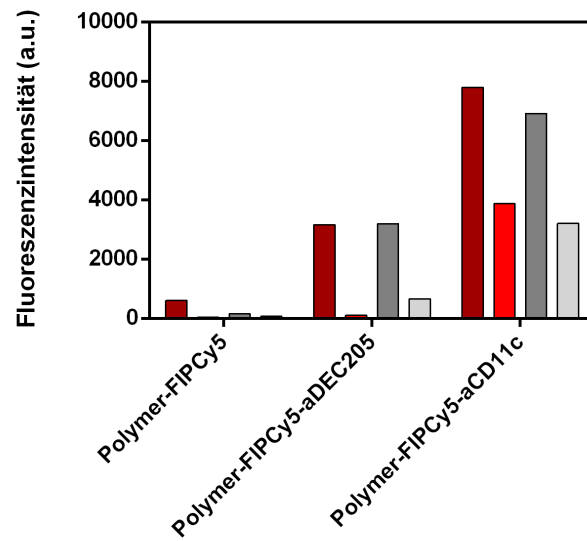


Abbildung 5-53: Bindung von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5,  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aDEC205 und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aCD11c Konjugat an  $\bullet$  CD8+ iDCs,  $\bullet$  CD8- iDCs,  $\bullet$  CD8+ mDCs und  $\bullet$  CD8- mDCs, 30 min, 4°C.

Zum allgemeinen Verständnis des SHIP-Experiments wird dies am Beispiel des Polymer-FIP-aDEC205 Konjugat anhand der in Abbildung 5-54 dargestellten Durchflusszytometrie Histogramme erklärt. Hierbei wird die Fluoreszenz des SHIP-Sensors (Cy5) vor und nach Zugabe des Quenchers verglichen. Links (a) sind die Histogramme für die Bindung nach 30 Minuten bei 4 °C und rechts (b) für die Internalisierung nach 90 Minuten bei 37 °C gezeigt.

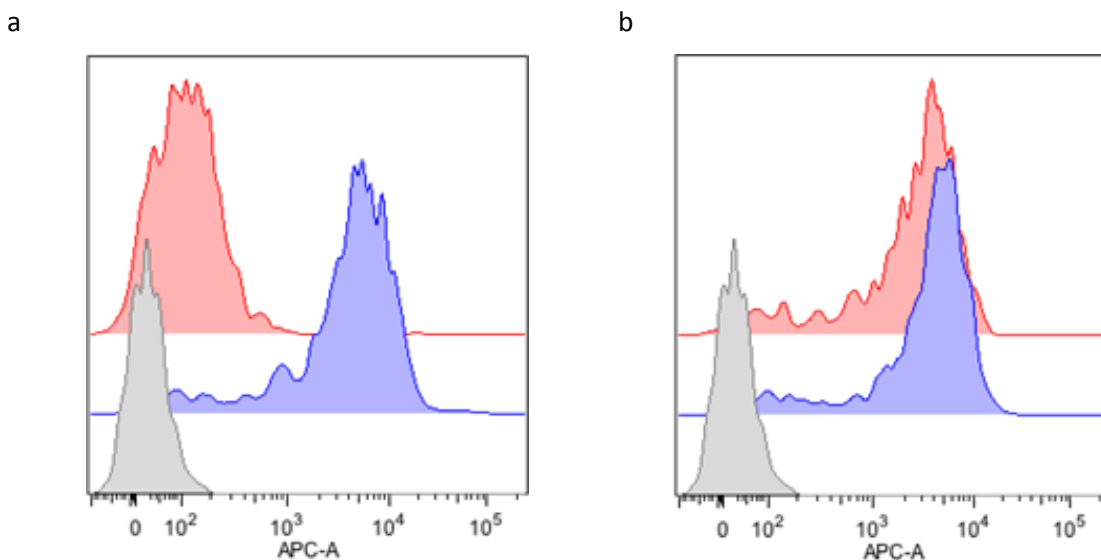


Abbildung 5-54: Durchflusszytometrie Histogramme, unreife DCs: a) 4 °C und 30 min; b) 37 °C und 90 min °C:  $\bullet$  Zellen,  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx –FIPCy5-aDEC205 ungequencht,  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx –FIPCy5-aDEC205 gequencht.

Nach Inkubation der Zellen mit der Probe wird vor Zugabe des Quenchers ein erhöhtes Fluoreszenzsignal für beide Inkubationszeiten erhalten (blau). Nach Zugabe des Quenchers bei 4 °C wird die Fluoreszenz der Probe, welche lediglich für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert wird, fast vollständig ausgelöscht (Abbildung 5-54-a). Dies bedeutet, dass die Probe hauptsächlich auf der Zelloberfläche gebunden ist. Hingegen bleibt das Fluoreszenzsignal der bei 37 °C für 90 Minuten internalisierten Probe fast vollständig erhalten. Somit wird die Probe nahezu komplett von der Zelle internalisiert (Abbildung 5-54-b).

Da wie bereits oben erwähnt unser Augenmerk auf den CD8+ DCs liegt, sollen im Folgenden Internalisierungskinetiken in dieser Zellpopulation genauer untersucht werden. Die prozentuale Internalisierung wird wie bereits in Kapitel 4.10 gezeigt, nach folgender Gleichung erhalten.

$$\% \text{ – Internalisation} = \frac{[I(\text{gequencht}, t=l) - I(\text{gequencht}, t=0)]}{[I(\text{ungequencht}, t=0) - I(\text{gequencht}, t=0)]} * 100 \quad (\text{Gl.5-8})$$

In Abbildung 5-55 ist die prozentuale Internalisierung für die drei zuvor gezeigten Konjugate in unreife- (a) und reife DCs (b) unter Berücksichtigung von „Capping“ gezeigt (vgl. Abschnitt 4.10). Generell ist eine etwas stärkere Internalisierung der Proben in unreife DCs erkennbar. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass bei reifen DCs generell die Endozytoserate herunterreguliert ist.<sup>[163, 164]</sup>

Beim Vergleich der Proben untereinander besitzt das Polymer-FIP-aDEC205 Konjugat die schnellste und höchste prozentuale Aufnahme in unreife sowie reife DCs. Nach 90 Minuten sind bereits 70% in unreife DCs und 36% in reife DCs internalisiert. Hingegen werden nur 15% des Polymer-FIP-aCD11c Konjugats von unreifen DCs und 6% von reifen DCs aufgenommen. Eine ähnlich niedrige Aufnahme zeigt die Kontrolle Polymer-FIP. Dieses wird mit 10% von unreifen DCs und mit 13% von reifen DCs aufgenommen. Dadurch, dass die Konjugate mit aDEC205 als Antikörper im Vergleich zu den Konjugaten mit aCD11c als Antikörper eine schnellere und effizientere Aufnahme in CD8+ DCs zeigt, werden zwei verschiedene Internalisierungsmechanismen angenommen. Diese Resultate stimmen sehr gut mit denen im Rahmen von [REDACTED] Dissertation erhaltenen Ergebnissen zur Internalisierung reiner Antikörper in DCs überein.<sup>[8]</sup>

Es ist bekannt, dass die verschiedenen Rezeptoren dendritischer Zellen diverse Internalisierungsgeschwindigkeiten besitzen. Des Weiteren werden je nach Rezeptor



unterschiedliche endozytotische Zellkompartimente adressiert. Allerdings sind bis heute die spezifischen Internalisierungsmechanismen nicht gut verstanden.<sup>[165, 169]</sup>

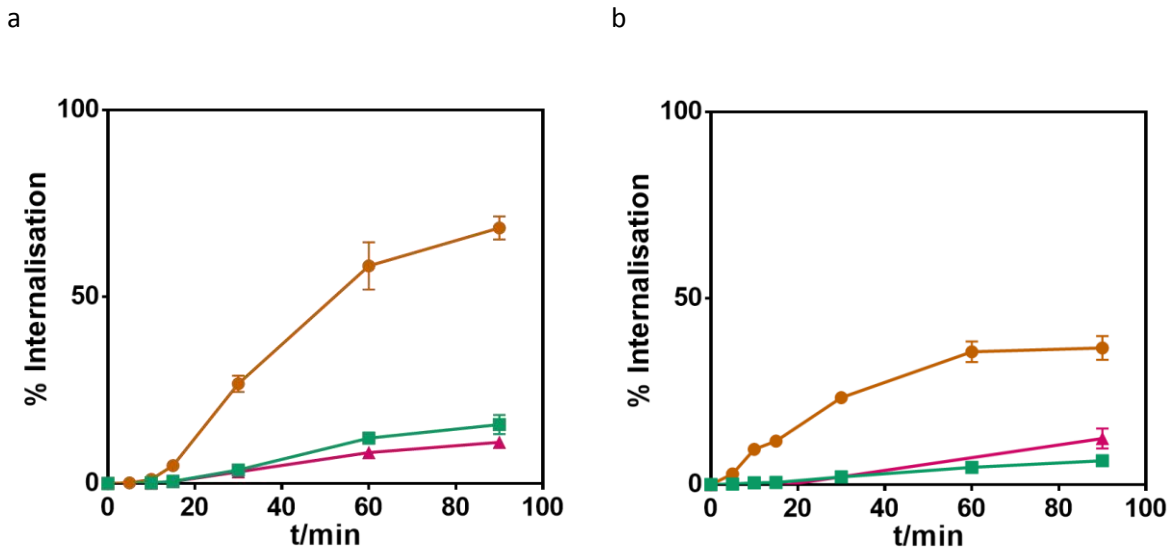


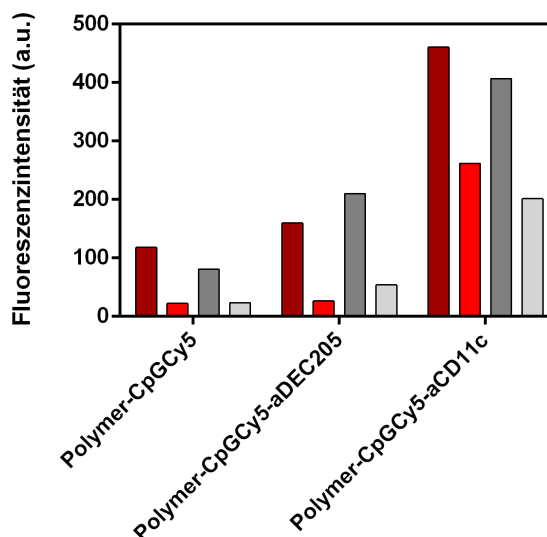
Abbildung 5-55: %-Internalisationskinetik von ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5, ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aDEC205 und ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aCD11c Konjugate in CD8+ DCs a) unreife DCs; b) reife DCs.

#### 5.4.3.2 Internalisierung mit CpG als SHIP-Sensor

Im Hinblick auf die Synthese des Zielsystems bestehend aus Polymer, Antigen, Antikörper und Adjuvans wird im Folgenden der Einfluss von CpG auf die Internalisierung untersucht. Hierzu wird anstelle des SHIP-Sensors FIPCy5 der SHIP-Sensor CpGCy5 verwendet. Analog zu Kapitel 5.4.3.1 werden die in Tabelle 4-1 gezeigten Konjugate synthetisiert.

Tabelle 5-19: Poly(2-oxazolin)bürsten-CpG(SHIP)-Antikörper-Konjugate

Probe	Polymer	CpGFIP	Antikörper
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5	1	13	-
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-aDEC205	1	13	8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-aCD11c	1	13	8



**Abbildung 5-56:** Bindung von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5,  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-aDEC205 und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-aCD11c Konjugate an  $\bullet$  CD8+ iDCs,  $\bullet$  CD8- iDCs,  $\bullet$  CD8+ mDCs und  $\bullet$  CD8- mDCs, 30 min, 4°C.

Die Bindung an unreifen sowie reifen CD8+/CD8- DCs ist in Abbildung 5-56 dargestellt. Das als Kontrolle dienende Polymer-CpGCy5 Konjugat zeigt nun bereits eine erhöhte Bindung an bevorzugt unreifen und reifen CD8+ DCs, die sich nur kaum von der Bindung der Antikörperkonjugate unterscheidet. Als Ursache für solch eine unspezifische Bindung ist wahrscheinlich die negative Ladung des CpGs zu betrachten. Da die unspezifische Bindung für das CpG stärker ausfällt als für das FIP wird als weiterer möglicher Grund das Vorhandensein des stabileren Phosphorthioester Rückgrats im CpG vermutet. Das für die SHIP-Versuche verwendete FIP hingegen enthält ein Phosphordiester Rückgrat. Diese Effekte wurden auch schon in älteren Arbeiten von Zhao et al. beobachtet.<sup>[170]</sup>

Im Vergleich zu den mit Antikörper beladenen Konjugaten fällt diesmal die unspezifische Bindung höher aus und kann somit nicht vernachlässigt werden. Hierzu folgt In Abschnitt 5.4.7 eine genauere Erörterung des Einflusses von CpG auf die Bindung an dendritischen Zellen. Für das Polymer-CpG-aDEC205 Konjugat wird analog zum Polymer-FIP-aDEC205 Konjugat eine bevorzugte Bindung an unreifen sowie reifen CD8+ DCs beobachtet. Ebenso zeigt das Polymer-CpG-aCD11c Konjugat aus den gleichen Gründen wie das Polymer-FIP-aCD11c Konjugat für beide Subpopulationen eine starke Bindung (CD8+ und CD8- DCs).

Die prozentuale Internalisierung der Polymer-CpG-Antikörper Konjugate ist in Abbildung 5-57 gezeigt. Auch hier zeigt das Konjugat mit dem angebondenen Antikörper aDEC205 im

Vergleich zum Konjugat mit aCD11c als Antikörper, eine viel schnellere und höhere Internalisierung in unreife und reife CD8+ DCs. Nach 60 Minuten wird für das Polymer-CpG-aDEC205 Konjugat eine Internalisierung von 91% in unreife und 67% in reife CD8+ DCs erhalten. Das Polymer-CpG-aCD11c Konjugat wird dagegen lediglich mit 26% von unreifen und mit 13% von reifen CD8+ DCs aufgenommen.

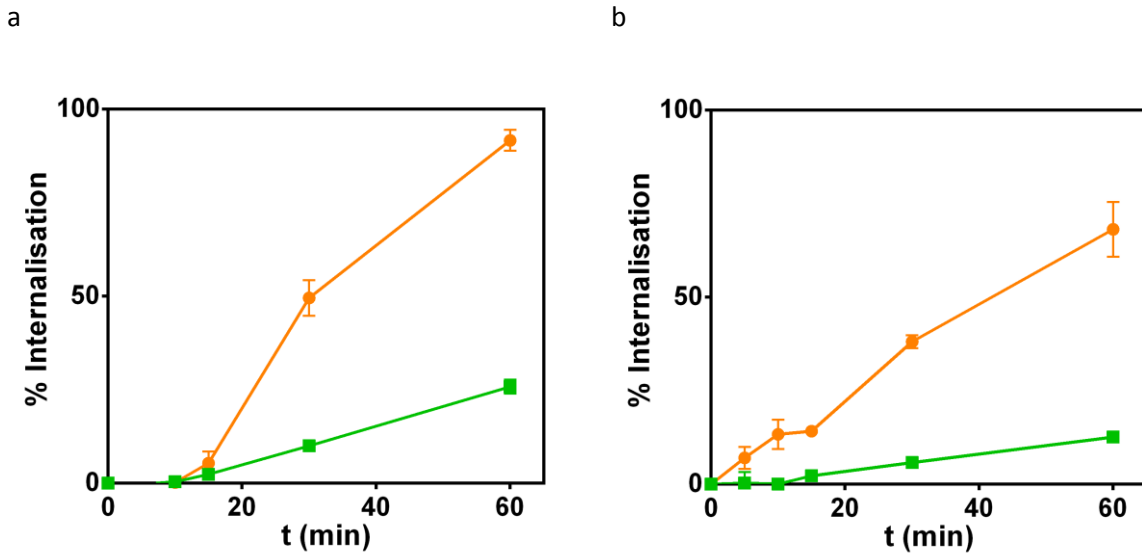


Abbildung 5-57: %-Internalisierungskinetik von ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-aDEC205 und ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-CpGCy5-CD11c Konjugate in CD8+ DCs a) unreife DCs; b) reife DCs.

#### 5.4.3.3 Zusammenfassung

Zur Adressierung dendritischer Zellen wurden Antikörper ausgewählt, welche spezifisch an bestimmte Oberflächenproteine anbinden: aCD11c (N418) für CD11c (auf allen DCs)<sup>[166]</sup> und aDEC205 zur Adressierung von CD205 (weitgehend nur auf den CD8+ DCs).<sup>[165, 171]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass das aDEC205-Polymer Konjugat spezifisch an CD8+ DCs und das aCD11c-Polymer Konjugat wie zu erwarten neben CD8+ DCs auch an CD8- DCs bindet.

Mit Hilfe der von Liu et al. entwickelten SHIP-Technik<sup>[139]</sup> wurde gezeigt, dass das aDEC205-Polymer Konjugat sehr schnell und in hohem Ausmaß von CD8+ DCs internalisiert wird. Das aCD11c-Polymer Konjugat zeigte eine viel geringere und langsamere Internalisierung in CD8+ DCs. Somit konnte demonstriert werden, dass die Aufnahme des Polymer-Antikörper Konjugats vom Rezeptor der Zielzelle abhängt. Da die Internalisierung in die Zelle im Hinblick auf den Zielort und somit die Wirkstofffreisetzung eine entscheidende Rolle spielt, ist die

Wahl eines geeigneten Antikörper/Rezeptor Paares sehr wichtig hinsichtlich der Synthese eines effektiven Wirkstoffträgersystems.<sup>[165]</sup>

Des Weiteren wurde auch nach Ausreifung der DCs eine rezeptorvermittelte Aufnahme des aDEC205-Konjugats in die Zellen beobachtet.

Durch den Austausch des SHIP Sensors FIP durch CpG wurde in Bezug auf die Internalisierungskinetik ein ähnliches Ergebnis erzielt. Auch hier zeigte das Polymer-aDEC205 Konjugat im Vergleich zum Polymer-aCD11c Konjugat eine viel schnellere und höhere Internalisierung in CD8+ DCs. Auffällig war jedoch die recht hohe Bindung des Polymer-CpG Konjugats, ohne Anbindung eines Antikörpers, an die CD8+ DCs.

Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass der Antikörper aDEC205 sehr gut zur Adressierung von CD8+ dendritischen Zellen geeignet ist. Daher wird im Verlauf dieser Arbeit der Antikörper aDEC205 weiterhin für die Synthese von Polymer-Antigen-Antikörper-(Oligonukleotid)-Konjugaten verwendet.

#### 5.4.4 Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen

Um eine mögliche biologische Anwendung der Polymerbürsten-Antikörper Konjugate als Vakzine zu erlangen, soll neben dem Antikörper aDEC205 zusätzlich das tumorassoziierte OVA-Antigen mit der SIINFEKL Sequenz sowie ein Adjuvans (CpG1826) an die Polymerbürste angebunden werden. Im folgenden Kapitel wird die Konjugation des Antigens an die Azid-funktionalisierte N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste sowie die im Anschluss folgende, bereits aus Kapitel 5.4.2.1 bekannte Konjugation des aDEC205 Antikörpers, beschrieben. Die Synthese des Vollkonjugats bestehend aus Polymer, Antigen, Adjuvans und Antikörper folgt in Kapitel 5.4.6.

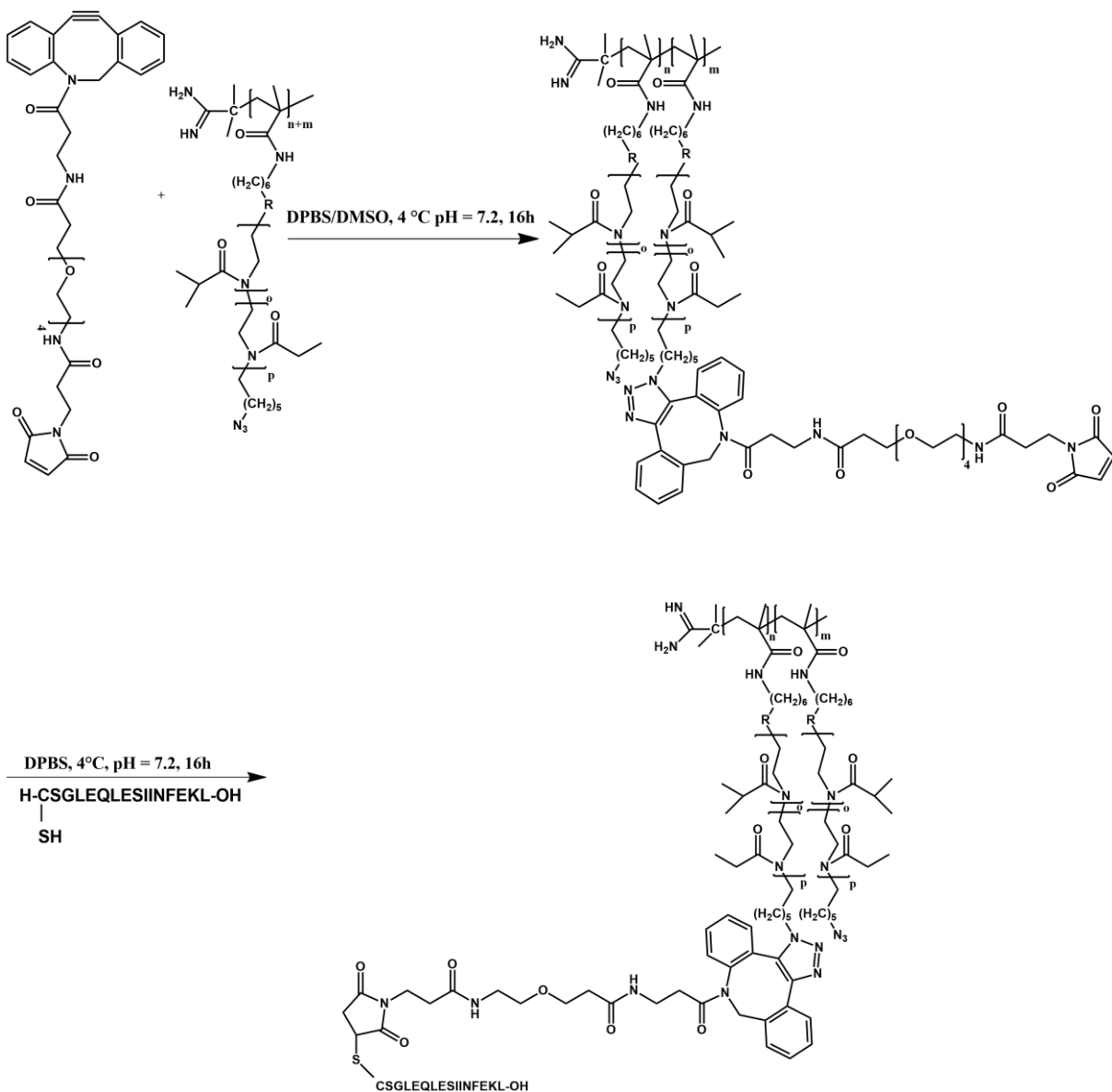


Abbildung 5-58: Reaktionsschema zur Konjugation von Antigenen an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

Zur Konjugation des Antigens wird als erstes die Azid-funktionalisierte Polymerbürste mittels kupferfreier 1-3 Cycloaddition mit dem heterobifunktionellen Linker Dibenzocyclooctin-PEG4-Maleinimid (DBCO-PEG4-MAL) umgesetzt. Zur gleichen Zeit wird das Antigen, welches am *N*-Terminus ein Cystein trägt mit Hilfe von TCEP reduziert. Dadurch werden die zur weiteren Reaktion notwendigen freien Thiol-Gruppen zugänglich. Nach Aufreinigung beider Komponenten reagiert schließlich das Antigen über seine freie Thiolgruppe mit der Maleinimid-funktionalisierten Polymerbürste unter Ausbildung einer stabilen Thioether-Bindung zum Polymer-Antigen Konjugat. Nicht umgesetztes Antigen wird mit Hilfe von „PALL Nanosep Devices 300 kDa“ abgetrennt.

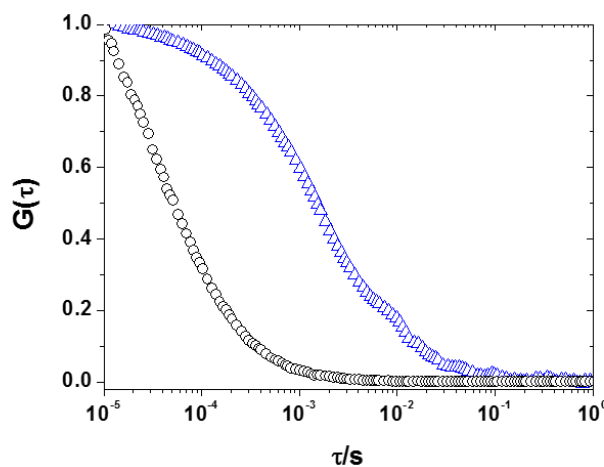
Die Anzahl der konjugierten Antigen Moleküle pro Polymerkette wird mittels UV-VIS Spektroskopie unter Einbeziehung der bekannten Anzahl an Farbstoffmoleküle (AF546) pro Antigen (Farbstoffmarkierung Antigen, siehe Abschnitt 7.5.4) und Polymer (AF488 bzw. CRh110) ermittelt. Es wird ein Konjugat mit 17 Antigen Molekülen pro Polymerbürste erhalten (Anhang Abbildung 8-23).

Abbildung 5-59 zeigt die SDS-Gelelektrophorese unter nichtreduzierenden Bedingungen. In Spur 1, 5 und 6 sind jeweils die Einzelkomponenten Polymerbürste (1) und das Antigen (5 und 6) aufgetragen. Die Polymerbürste kann aufgrund ihrer Größe das Gel nicht migrieren und bleibt somit in der Geltasche zurück. Das Antigen hingegen läuft in Folge seines geringen Molekulargewichts von 1.800 g/mol mit der Front des Laufpuffers. Die zweite Spur dient als Negativkontrolle, hier ist eine Mischung aus nichtmodifiziertem Polymer sowie Antigen zu sehen. Es sind deutlich die zwei Banden der Polymerbürste und des Antigens identifizierbar. Das Konjugat ist in den Spuren 3 und 4 aufgetragen. In beiden Spuren ist kein freies Antigen erkennbar, es wird lediglich eine Bande in der Tasche detektiert, welche dem Konjugat zuzuordnen ist.



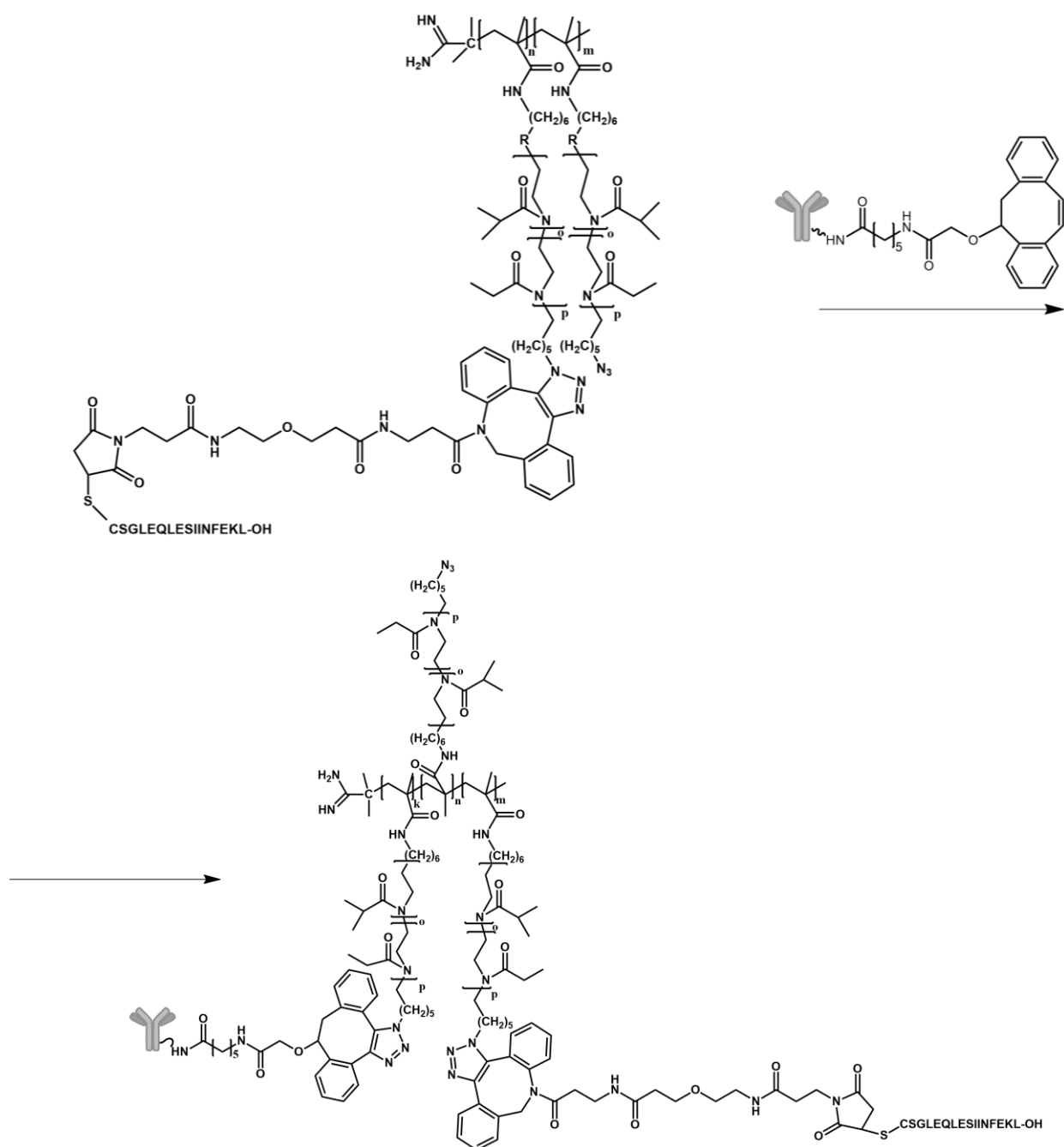
**Abbildung 5-59:** 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (nichtreduzierende Bedingungen); Tasche 1:  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488 (30 ng-Polymer), Tasche 2:  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488 + Antigen-AF546 (Negativkontrolle); Tasche 3:  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Antigen-AF546 (30 ng-Antigen); Tasche 4:  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Antigen-AF546 (30 ng-Antigen); Tasche 5: Antigen-AF546 (165 ng); Tasche 6: Antigen-AF546 (30 ng).

In Abbildung 5-60 sind die beiden aus der FCS erhaltenen AKF des Polymerbürsten-Antigen Konjugats (blau) sowie des freien AlexaFluor546 Farbstoffs bzw. Antigen (schwarz) bei einer Anregung mit  $\lambda = 543$  nm gezeigt. Das Polymer-Antigen Konjugat ist diesmal lediglich über das Antigen fluoreszenzmarkiert. Dadurch, dass die AKF des Konjugats zu deutlich größeren Korrelationszeiten verschoben ist, wird das Ergebnis der Gelelektrophorese und demnach eine erfolgreiche Konjugation bestätigt.



**Abbildung 5-60:** FCS Autokorrelationsfunktionen --- AF546 und ---  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-AF546 in 1X PBS,  $\lambda = 543$  nm,  $T = 295.15$  K.

## 5.4.5 Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen-aDEC205



**Abbildung 5-61: Reaktionsschema zur Konjugation von aDEC205 Antikörper an das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen Konjugat**

Für die Synthese des Polymerbürsten-Antigen-aDEC205 Konjugats wird aus sterischen Gründen zuerst das Antigen und im Anschluss der Antikörper an die Polymerbürste angebunden. Die Synthese erfolgt analog zu der in Kapitel 7.5.8 beschriebenen Synthesestrategie.

Mittels UV-VIS Spektroskopie werden 17 Antigen- und 8 Antikörper Moleküle pro Polymerbürste ermittelt (Abbildung 5-62).



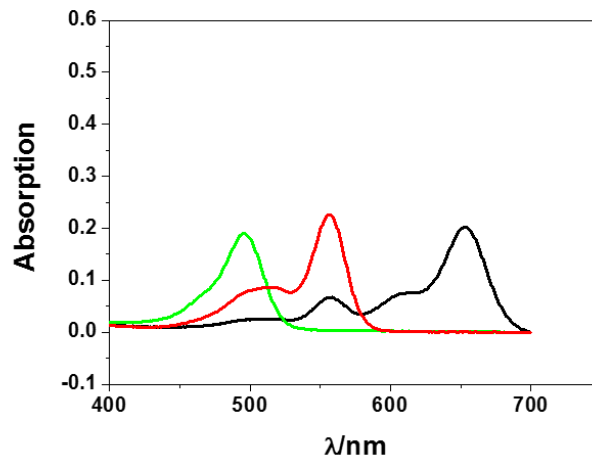


Abbildung 5-62: UV-VIS Spektrum von ●  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-AF488, ●  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-AF488-Antigen-AF546 und ●  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-AF488-Antigen-AF546-aDEC205-AF647

Die folgende Abbildung zeigt die aus der FCS erhaltenen AKF des Polymerbürsten-Antigen-Antikörper Konjugats (rot), des Polymerbürsten-Antigen Konjugats (blau) und die des freien Farbstoffs AF546 (schwarz). Für das Polymerbürsten-Antigen-Antikörper Konjugat wird ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 36$  nm erhalten.

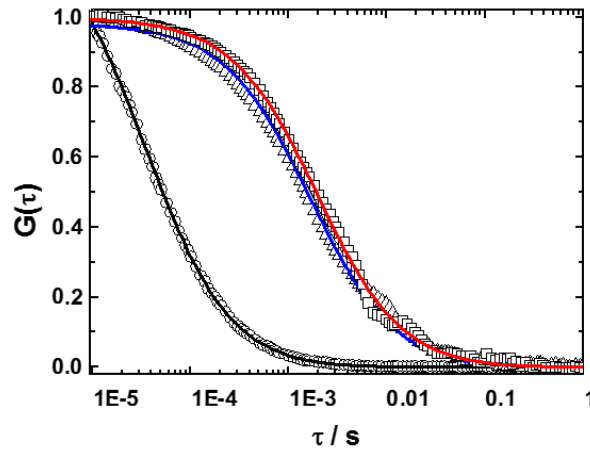


Abbildung 5-63: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- AF546; ---  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-AF546 und ---  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-AF546-aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 543$  nm,  $T = 295.15$  K.

Die erfolgreiche Konjugation von Antigen und Antikörper an die  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste wird anhand der in Abbildung 5-64 illustrierten Ergebnissen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) verdeutlicht. Hierbei ist der Zellkern in türkis, der Antikörper in rot, das Antigen in blau und die Polymerbürste in grün dargestellt. Das Konjugat zeigt eine perfekte Kolokalisation (pink) aller Komponenten in BMDCs.

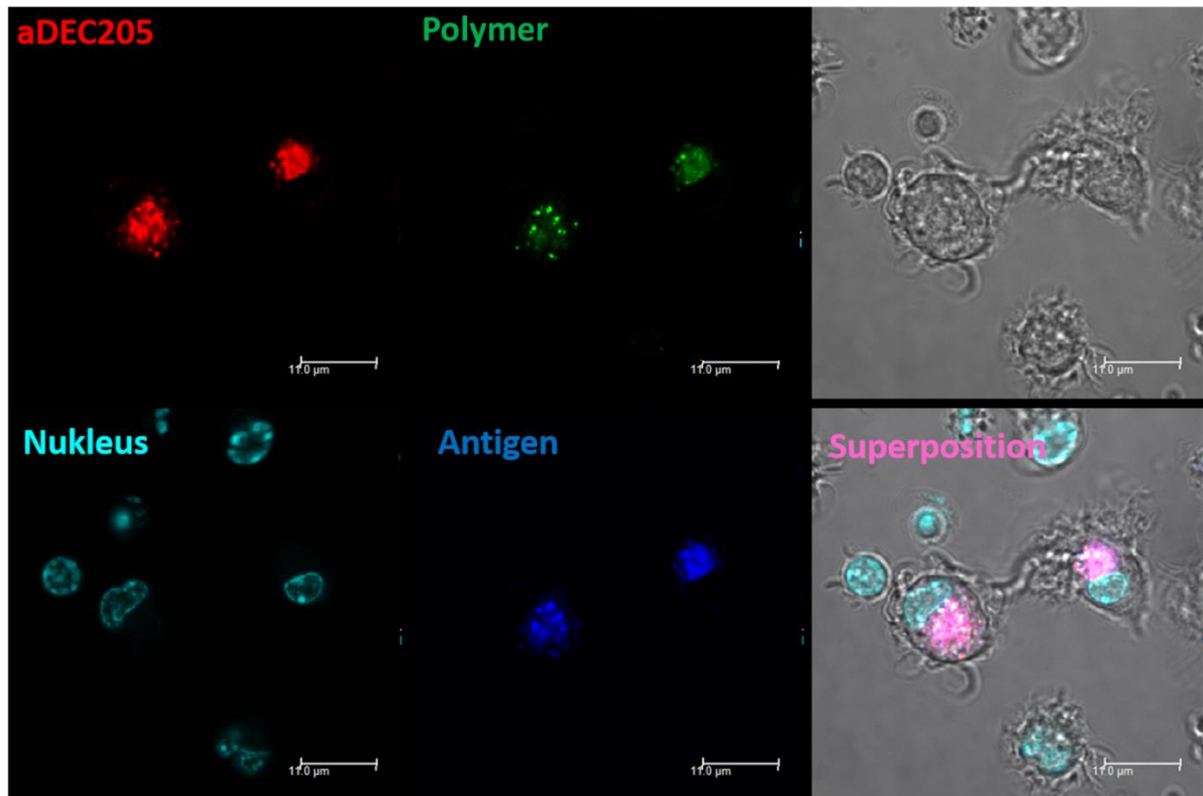


Abbildung 5-64: CLSM Aufnahmen an BMDCs: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; Türkis: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488); blau: Antigen-AF546; Pink: Kolokalisation ( $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Antigen-AF546-aDEC205-AF647); Maßstab Balken: 11 µm.

#### 5.4.6 Poly(2-oxazolin)bürste-Antigen-CpG-Antikörper(aDEC205 bzw. aCD11c)

Die Synthese des Polymerbürsten-Antigen-CpG-aDEC205/aCD11c Konjugats erfolgt ähnlich zu der des Polymerbürsten-Antigen-aDEC205/aCD11c Konjugats. Auch hier wird aus sterischen Gründen zuerst das Antigen gefolgt vom Adjuvans CpG und im Anschluss der Antikörper an die Polymerbürste über kupferfreie Click-Chemie angebunden (vgl. Kapitel 7.5.10). Es werden die in Tabelle 5-20 dargestellten Verbindungen erhalten.

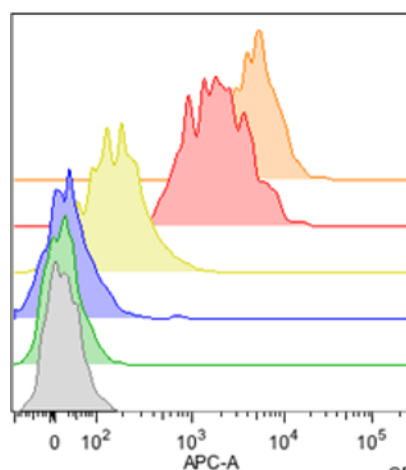
Tabelle 5-20: Poly(2-oxazolin)bürsten-Konjugate

Probe	Polymer	Antigen	CpG	Antikörper
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG	1	17	-	8
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG-aDEC205	1	17	-	8
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG-aCD11c	1	17	-	8
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG	1	17	12	8
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG-aDEC205	1	17	12	8
$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG-aCD11c	1	17	12	8

#### 5.4.7 Untersuchung des Einflusses von CpG auf die Zellanbindung

In Abschnitt 5.4.3.2 wird gezeigt, dass das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpGCy5 Konjugat unspezifisch an DCs bindet. Demnach wird im folgenden Kapitel der Einfluss von CpG auf die Zellanbindung untersucht. Hierzu werden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C mit unreifen Milz-DCs inkubiert und mittels FACS analysiert.

In Abbildung 5-65 sind die nach FACS-Analyse erhaltenen Durchflusszytometrie Histogramme der murinen CD8<sup>+</sup> Milz-DCs nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C abgebildet. Die reine N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (grün) und das reine CpG (blau) zeigen keine Zellanbindung. Für das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-aDEC205 Konjugat (gelb) wird ein Histogramm erhalten, welches zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal verschoben ist und somit an die Zellen bindet. Sehr auffällig ist das zu noch höheren Fluoreszenzsignalen verschobene Histogramm des N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugats (rot). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anbindung von CpG an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste zu einer hohen unspezifischen Bindung an DCs führt. Da jedoch das in gleicher Partikelkonzentration aufgegebene CpG alleine (blau) keine Bindung zeigt, scheint das Zusammenspiel von mehreren CpG Molekülen eine entscheidende Rolle zu spielen. Nach zusätzlicher Anbindung des Antikörpers aDEC205 wird die Bindung erwartungsgemäß noch einmal verstärkt (orange).



**Abbildung 5-65: Durchflusszytometrie Histogramme, unreife Milz-DCs: Konjugate: ● Zellen, ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx, ● freies CpG, ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205(8), ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx -CpG(12), ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-CpG(12)-aDEC205(8); unreife CD8<sup>+</sup> Milz-DCs, 30 min bei 4 °C; 1\*10<sup>12</sup> Partikel/5\*10<sup>5</sup> Zellen.**

Für die zuvor gezeigten Versuche sind pro Polymerbürste durchschnittlich 12 CpG-Moleküle angebunden. Als nächstes wird aufgrund der erhaltenen hohen unspezifischen Zellanbindung untersucht, wieviele CpG-Moleküle pro Polymerkette zur Ausreifung bzw. Aktivierung von DCs ausreichen. Weiterhin wird der Zusammenhang zwischen der Anzahl angebundener CpG-Moleküle und unspezifischer Zellanbindung bzw. Zellaufnahme sowie Aggregation in humanem Serum untersucht. Es werden drei Konjugate, bestehend aus Polymer und CpG (mit verschiedenen CpG-Konzentrationen) hergestellt und für 24 h bei 37 °C mit murinen Milz-DCs inkubiert.

In Abbildung 5-66 ist die Zellaufnahme/bindung gegenüber der Zellausreifung für die verschiedenen N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugate sowie für die reine N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste dargestellt. Hierbei ist erkennbar, dass mit Zunahme der CpG-Moleküle pro Polymerbürste die unspezifische Bindung/Aufnahme und gleichzeitig die Ausreifung zunehmen. Dieser Trend verläuft bis zu einer Anzahl von 5 CpG-Molekülen linear, wohingegen die Ausreifung nach Anbindung von 10 CpG-Molekülen deutlich ansteigt. Dies zeigt wieder, dass der Effekt von CpG durch die hohe räumliche Konzentration deutlich verstärkt wird. Festzuhalten ist, dass die Anbindung von einem CpG-Molekül einen geringen Einfluss auf die Aufnahme und Aktivierung zeigt. Nach Anbindung von 5-10 CpG-Molekülen wird schließlich eine ausreichende bis starke Ausreifung erlangt, welche jedoch mit einer unspezifischen Zellaufnahme einhergeht.

Bei der Untersuchung des Aggregationsverhaltens in humanem Serum wird für alle drei N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugate eine kaum detektierbare Aggregation erhalten und kann somit vernachlässigt werden (Anhang Abbildung 8-25).

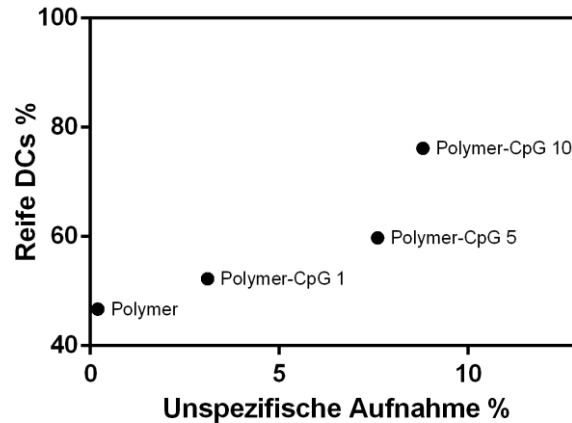


Abbildung 5-66: FACS-Messung: Reifung von BMDCs nach Bindung/Aufnahme von:  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx,  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (1),  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (5) und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (10); Zellen in 1X PBS, Inkubationszeit 24 h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen.

In einem weiteren Experiment wird untersucht, ob nach Zugabe von Serum die durch CpG verursachte unspezifische Zellaufnahme unterdrückt werden kann. Hierzu werden die Milz-DCs vor Zugabe der zuvor gezeigten  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugate mit murinem Serum inkubiert. Durch Vorinkubation der Zellen mit Serum und somit der Blockierung verschiedener Rezeptoren, über welche sehr wahrscheinlich die negativ geladenen CpG-Moleküle binden (Scavenger-Rezeptoren), kann die unspezifische Bindung bzw. Aufnahme für alle Konjugate weitestgehend verhindert werden (Abbildung 5-67).

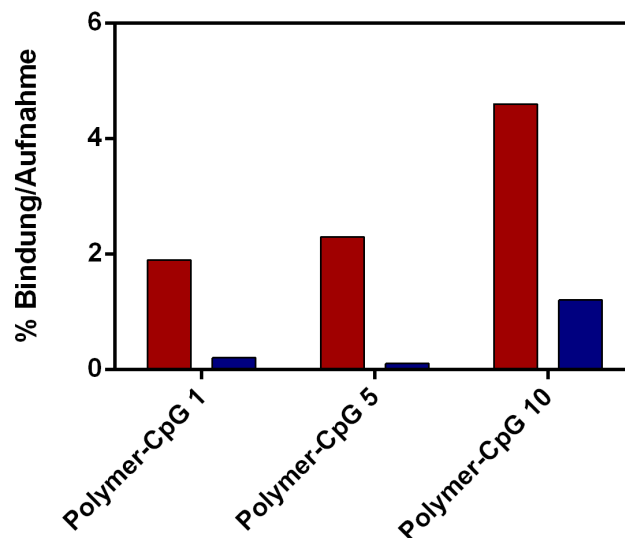
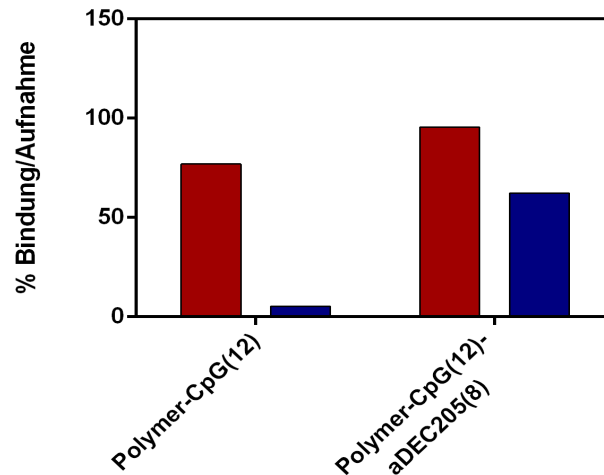


Abbildung 5-67: FACS-Messung: Zellaufnahme/Bindung in/an Milz-DCs von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (1),  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (5) und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG (10); ● ohne Serum und ● nach Vorinkubation der Zellen mit Serum; Zellen in 1X PBS, Inkubationszeit 24h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen.

Des Weiteren wird nachgeprüft, ob die Zellaufnahme/Bindung der Konjugate auch nach Anbindung des Antikörpers aDEC205 durch Serum unterdrückt wird. Diese Versuche werden diesmal an BMDCs durchgeführt. Abbildung 5-68 zeigt, dass das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG(12) Konjugat zu 77% von CD11c+ BMDCs aufgenommen/angebunden wird. Durch Vorinkubation der Zellen mit Serum wird diese Aufnahme bzw. Bindung auf 5% herunterreguliert. Durch Anbindung von aDEC205 an das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugat wird die Zellaufnahme/Bindung verstärkt. Es werden 95% von CD11c+ BMDCs aufgenommen/gebunden. Nach Vorinkubation der Zellen mit Serum wird diese lediglich auf 62% reduziert. Die Konjugate werden wie in Kapitel 5.4.2.4 beschrieben, also trotz Vorinkubation mit Serum sehr effektiv ausschließlich spezifisch über den DEC205-Rezeptor in die Zellen aufgenommen bzw. an die Zellen angebunden.

Die erhaltenen Ergebnisse zur Unterdrückung der Zellaufnahme/Zellanbindung durch Vorinkubation mit Serum stehen jedoch im Widerspruch zu einem aus der Literatur bekannten Ergebnis. Lahoud und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CpG ebenso wie der Antikörper aDEC205 spezifisch an den DEC205 Rezeptor bindet und von diesem in die Zelle aufgenommen wird. Da die Vorinkubation mit Serum nicht zur Herunterregulierung der DEC205-vermittelten Zellaufnahme/Bindung führt, sollten somit nach Lahoud et al. auch die Polymer-CpG Konjugate weiterhin aufgenommen/gebunden werden.<sup>[99]</sup> Deshalb klingt es eher wahrscheinlich, dass die CpG-Aufnahme/Bindung, wenn spezifisch, dann wohl eher über einen anderen, durch Serum blockierbaren Rezeptor erfolgen kann.



**Abbildung 5-68: FACS-Messung: Bindung/Aufnahme an bzw. in CD11c+ BMDCs von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG(12) und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG(12)-aDEC205(8); ● ohne Serum und ● nach Vorinkubation der Zellen mit Serum; Zellen in 1X PBS, Inkubationszeit 24h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen.**

#### 5.4.7.1 Zusammenfassung

Die Konjugation von Antigen, CpG und Antikörper aDEC205 über kupferfreie Click-Chemie war erfolgreich. In der SDS-PAGE wurde nach erfolgter Konjugation lediglich eine dem Konjugat zuzuordnende Bande detektiert. Mittels FCS wurde für das Polymerbürsten-Antigen-aDEC205 Konjugat ein hydrodynamischer Radius von  $R_h = 36$  nm bestimmt. Zudem zeigten die CLSM-Bilder eine Superposition aller drei Komponenten, was eindeutig für eine erfolgreiche Konjugation spricht.

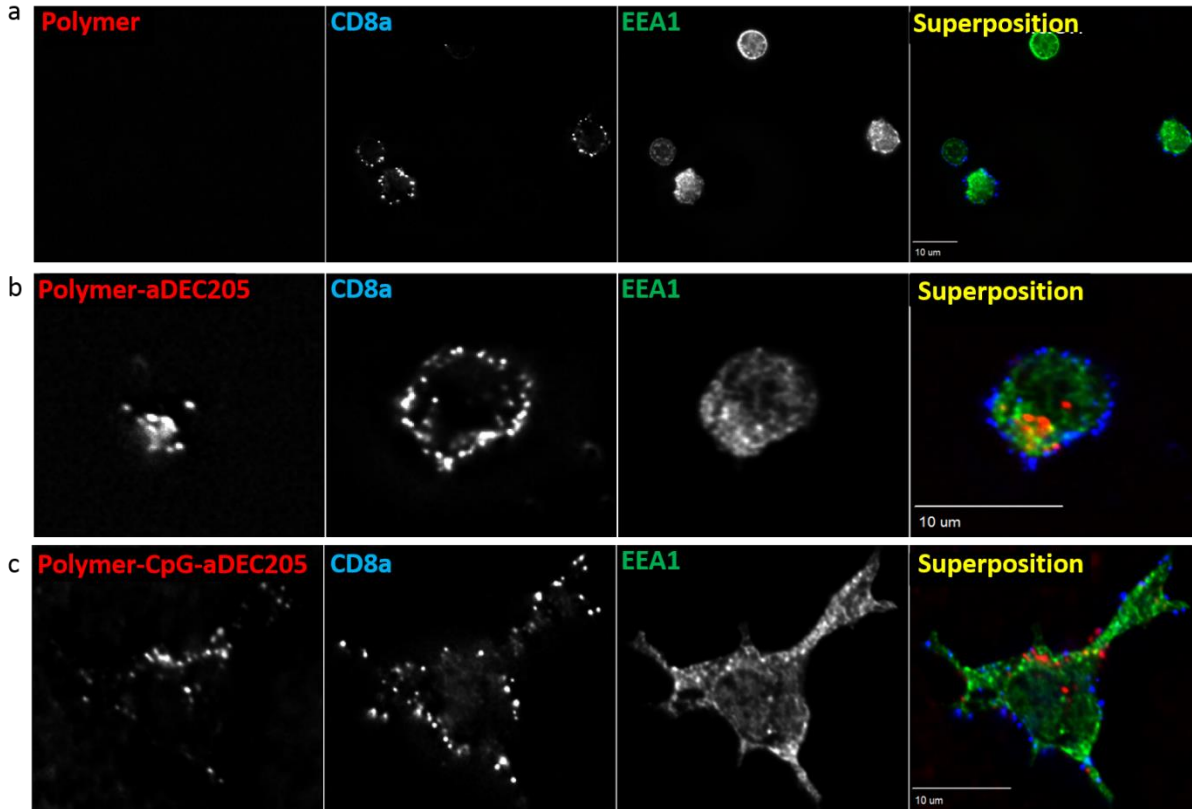
Die Anbindung von CpG an die reine  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste geht mit einer unspezifischen Bindung an DCs einher. Mit zunehmender Anzahl angebundener CpG-Molekülen steigt diese weiter an. Des Weiteren konnte parallel dazu eine Zunahme der Zellausreifung beobachtet werden.

Durch Vorinkubation der Zellen mit Serum gelang es die zuvor beobachtete unspezifische Zellaufnahme/bindung weitestgehend zu unterdrücken. Nach zusätzlicher Anbindung des Antikörpers aDEC205 an das  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugat wurde dieses wiederum trotz Seruminkubation wie erwünscht weiterhin spezifisch über den DEC205 Rezeptor von den DCs aufgenommen/gebunden, wobei der Anteil unspezifischer Bindung circa 30% beträgt.

#### 5.4.8 Intrazelluläre Lokalisierungsexperimente

In Kapitel 5.2.4.2 und 5.4.2.4 wird gezeigt, dass die reine N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste keine unspezifische Aufnahme in DCs zeigt, jedoch nach Anbindung von aDEC205 spezifisch von CD8<sup>+</sup> DCs aufgenommen wird. Im Folgenden soll nun die intrazelluläre Verteilung der internalisierten N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-(CpG)-aDEC205 Konjugate mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Hierzu werden Experimente zur Kolo-kalisation der Konjugate in verschiedenen Zellkompartimenten durchgeführt. Es werden reife murine Milz-DCs verwendet. Diese werden mit den verschiedenen Konjugaten (Abschnitt 7.9, Tabelle 7-14) für 2 h bei 37 °C inkubiert, im Anschluss fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Markern (anti-LAMP-1 für das späte Endosom/Lysosom und anti-EEA1 für das frühe Endosom) über Nacht bei 4 °C inkubiert. In den nachfolgenden Abbildungen ist das Polymer/Konjugat in rot, die CD8a<sup>+</sup> DCs in blau und das jeweilige Zellkompartiment in grün dargestellt. Die gelbe Färbung deutet auf eine Kolo-kalisation zwischen dem jeweiligen Kompartiment und der internalisierten Probe hin. Abbildung 5-69 zeigt erwartungsgemäß keine Aufnahme der reinen N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste in die CD8<sup>+</sup> DCs (a). Das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-aDEC205- (b) und das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG-aDEC205 Konjugat (c) werden von den CD8<sup>+</sup> DCs aufgenommen, zeigen aber keine Kolo-kalisation mit dem frühen Endosom.



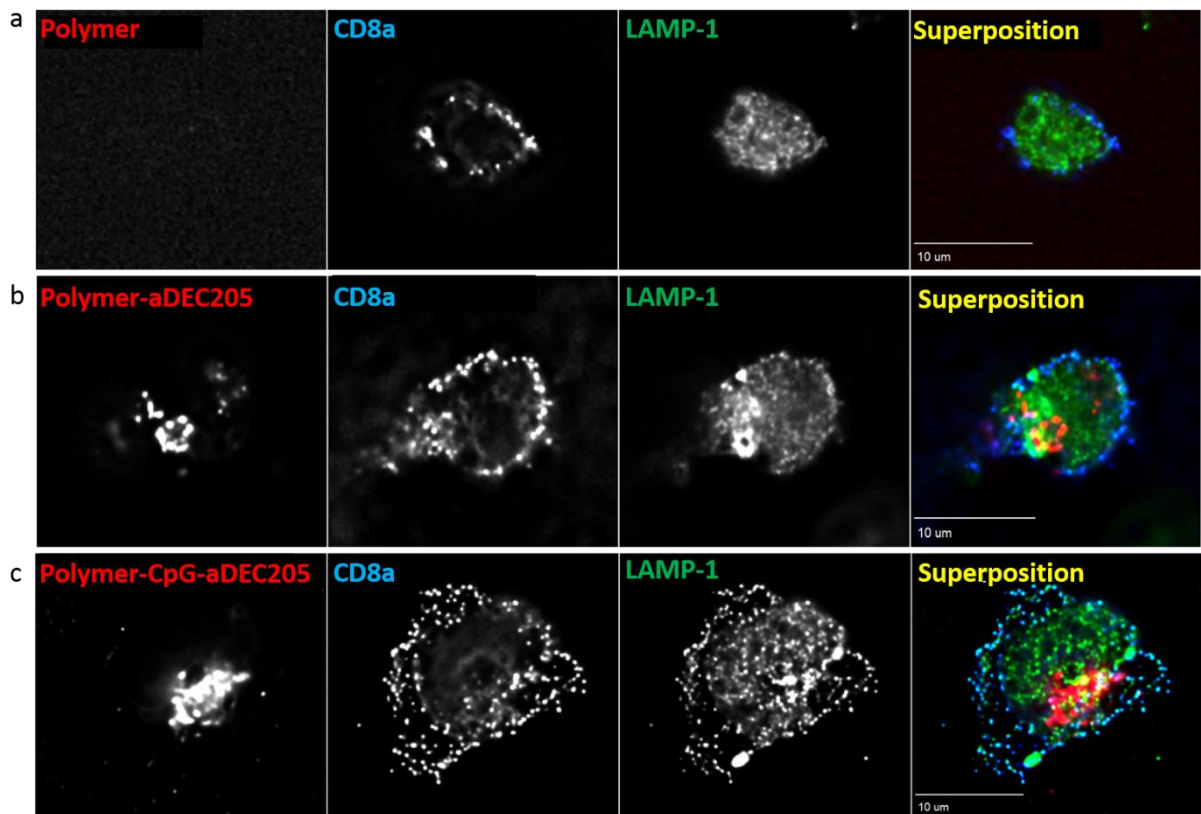


**Abbildung 5-69: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von reifen Milz-DCs inkubiert mit Polymer/Konjugat (rot); Phänotypisierung: CD8a (blau) und EEA1 (grün): (a)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx, (b)  $N_3$ -PEtOx-b-iPrOx-aDEC205 und (c)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG-aDEC205; inkubiert für 2h bei 37 °C, Maßstabbalken: 10  $\mu$ m.**

In Abbildung 5-70 und Abbildung 5-71 sind die Mikroskopie-Aufnahmen der mit LAMP-1 gefärbten Zellen dargestellt. Bei diesen beiden Abbildungen handelt es sich jeweils um die gleichen Proben. Wie bereits oben zeigt das reine Polymer keine Aufnahme und die beiden Konjugate eine Aufnahme in CD8+ DCs. Des Weiteren wird für die beiden Konjugate,  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-aDEC205 und  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-CpG-aDEC205 für sehr wenige Bereiche eine Kolo-kalisation mit dem späten Endosom/Lysosom erhalten. Typischerweise wird für Endozytoserezeptoren ein Aufnahmemechanismus über das frühe Endosom erhalten.<sup>[161]</sup> Mahnke et al. konnten jedoch zeigen, dass der Antikörper aDEC205, welcher über den Multilektin-Rezeptor DEC205 in die Zelle endozytiert wird, eine Kolo-kalisation mit dem LAMP-1 Protein zeigt und somit im späten Endosom/Lysosom angesammelt wird.<sup>[161]</sup>

Demnach stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse, bei denen keine Kolo-kalisation mit dem frühen Endosom und für wenige Bereiche eine Kolo-kalisation mit dem späten Endosom

erhalten wird, einigermaßen mit denen von Mahnke et al. überein. Der größte Teil der Konjugate ist jedoch weder in frühen noch in späten endosomalen Kompartimenten lokalisiert. Dies könnte gegebenenfalls darauf hindeuten, dass sie dem typischen endosomalen Aufnahmeweg in die Zellen entkommen sind. Möglicherweise befinden sie sich in anderen vesikulären Kompartimenten (z.B. ER) oder sogar im Cytosol, wo sie unmittelbar einem proteasomalen Abbau und dem anschließenden Einbau in MHC-I Moleküle, welcher im ER stattfindet (siehe Abschnitt 3.2.2), zugänglich wären.



**Abbildung 5-70:** Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von reifen Milz-DCs inkubiert mit Polymer/Konjugat (rot); Phänotypisierung: CD8a (blau) und LAMP1 (grün): (a)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx, (b)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 und (c)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG-aDEC205; inkubiert für 2h bei 37 °C; Maßstabbalken: 10 µm.

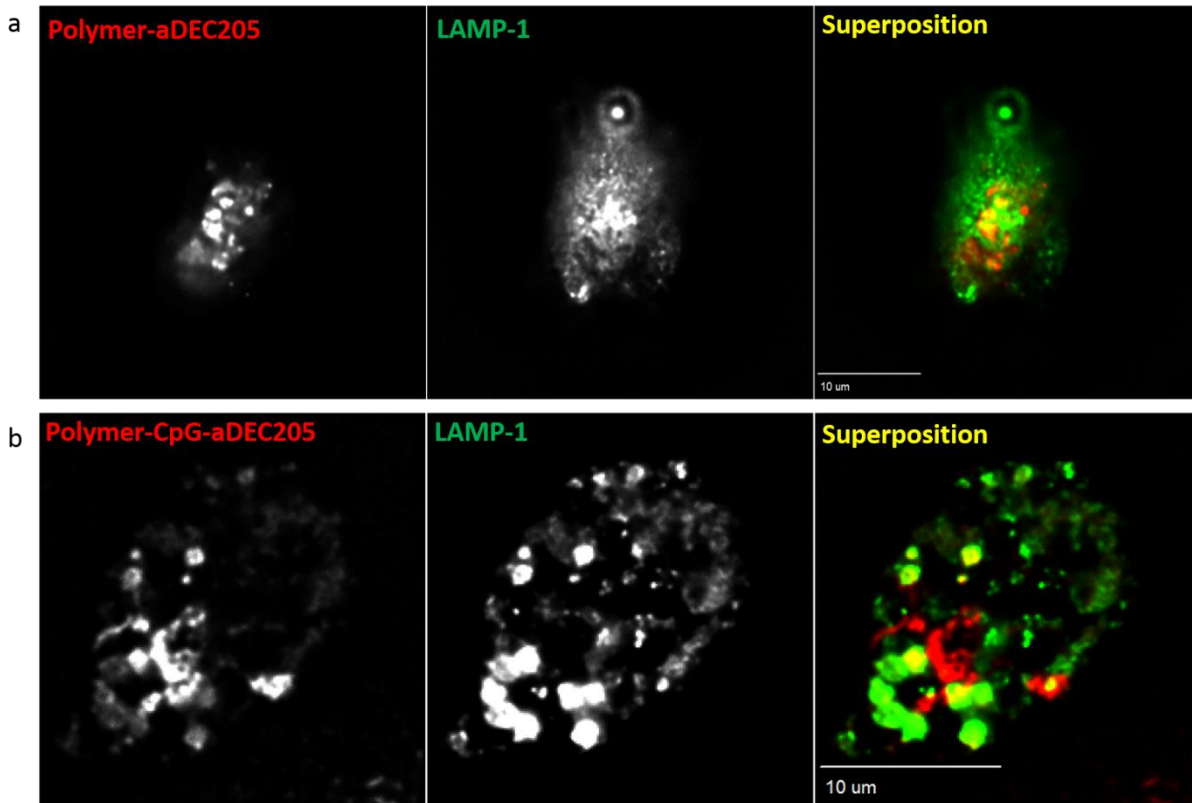


Abbildung 5-71: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von reifen Milz-DCs inkubiert mit Polymer/Konjugat (rot); Phänotypisierung und LAMP1 (grün): (a)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 und (b)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG-aDEC205; inkubiert für 2h bei 37 °C; Maßstabbalken: 10  $\mu$ m.

#### 5.4.8.1 Zusammenfassung

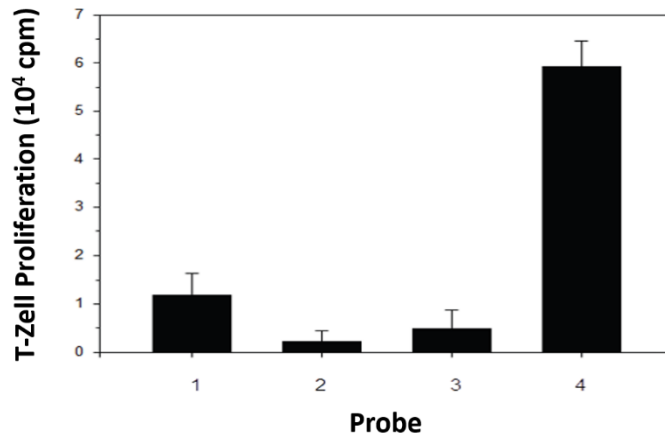
Die intrazelluläre Verteilung der  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-(CpG)-aDEC205 Konjugate zeigte keine Kolokalisation mit den frühen endosomalen und eine eher mäßige Kolokalisation mit den späten endosomalen Kompartimenten. Um den Einfluss der intrazellulären Verteilung des Konjugats auf die Fähigkeit zur CD8<sup>+</sup> T-Zell Kreuzpräsentation zu testen, werden im anschließenden Kapitel einige  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-(CpG)-Antikörper Konjugate in Versuchen zur T-Zell Proliferation eingesetzt.

### 5.4.9 T-Zell Proliferation

#### 5.4.9.1 T-Zell Proliferation an unreifen BMDCs

Die Fähigkeit dendritischer Zellen, Antigene zu prozessieren sowie sie anschließend auf der Zelloberfläche in Form eines MHC I/II Komplexes zu präsentieren, wird anhand eines CD8+ T-Zell-Proliferationsversuchs an unreifen dendritischen Knochenmarkzellen (BMDCs) untersucht. Diese Versuche werden von [REDACTED] und [REDACTED] am Institut für Dermatologie der Uniklinik Mainz durchgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf die von [REDACTED] hergestellten N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten sowie die in Kapitel 5.4.4 und 5.4.5 synthetisierten Polymerbürsten Konjugate. Unstimulierte BMDCs werden in parallelen Ansätzen jeweils mit dem C-SGLEQLE-SIINF EKL Peptid, mit der reinen nichtkonjugierten N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste, mit dem N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen Konjugat und dem N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-Antikörper(aDEC205) Konjugat für 4h vorinkubiert. Hierbei sind die Mengen an Antigen bzw. an Polymer gleich. Im Anschluss werden die vorbehandelten BMDCs mit SIINF EKL-Peptid spezifischen CD8+ T-Zellen (OT-I) co-kultiviert. Nach 72 h wird <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben und am folgenden Tag anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin das Ausmaß der Zellteilung bestimmt.

Abbildung 5-72 zeigt, dass BMDCs vorinkubiert mit dem N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-aDEC205 Konjugat (4) eine viel stärkere Proliferation der CD8+ T-Zellen induzieren als BMDCs, welche jeweils mit dem Antigen alleine (1) oder mit dem N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen Konjugat ohne aDEC205 (3) inkubiert werden. Die unkonjugierte Polymerbürste dient als Negativkontrolle (2) und löst erwartungsgemäß keine T-Zell Proliferation aus. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine gezielte Adressierung dendritischer Zellen und eine anschließende rezeptorvermittelte Endozytose (aDEC205) notwendig sind um eine starke T-Zell Proliferation hervorzurufen und dies mit dem Vollkonjugat erreicht werden kann.



**Abbildung 5-72: Antigenpräsentationsassay an BMDCs vorinkubiert mit zylindrischen Polymerbürsten (4 h) und T-Zellen (48 h); 1) C-SGLEQLE-SIINFEKL Peptid, 2) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx, 3) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen, 4) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aDEC205; 1\*10<sup>12</sup> Partikel (Peptid) / 5\*10<sup>5</sup> DCs.**

#### 5.4.9.2 T-Zell Proliferation an reifen Milz DCs

Da unreife DCs Antigene über unterschiedliche Mechanismen - unspezifisch als auch über rezeptorvermittelte Endozytose - aufnehmen können, kann relativ einfach eine große Menge an Antigenen in die Zelle transportiert werden.<sup>[65]</sup> Aufgrund der geringen Expression von MHC- sowie kostimulatorischen Molekülen ist es jedoch schwierig eine starke Immunantwort von unreifen DCs zu erhalten.<sup>[172]</sup>

Demnach besteht das Risiko der Induktion einer Immuntoleranz, falls keine ausreichend starke Antwort erzeugt wird.

Hingegen wird bei reifen DCs die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen hochreguliert. Somit sind diese deutlich besser zur Antigenpräsentation geeignet und sollten eine verstärkte Immunantwort erzeugen.<sup>[173]</sup>

Die in diesem Kapitel gezeigten T-Zell Proliferationsversuche (Antigen Kreuzpräsentation Versuche) werden in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] unter Betreuung von [REDACTED] und [REDACTED] am „Molecular Science and Biotechnology Institute“ der Universität Melbourne durchgeführt.

Über Nacht ausgereifte Milz-DCs werden mit den in Tabelle 5-21 gezeigten Proben mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen an Antigen (1\*10<sup>-7</sup> M – 1\*10<sup>-12</sup> M) für 45 Minuten bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Währenddessen werden OT-I T-Zellen aus murinen Lymphknoten isoliert und mit CD8-AF488 und Vα2-PE angefärbt um zu prüfen, ob die Mehrheit der Zellen antigenspezifische CD8+ Vα2+ T-Zellen sind.

V $\alpha$ 2-PE färbt die T-Zell Rezeptor (TCR) alpha Kette V $\alpha$ 2. Dies ist eine spezifische alpha Kette, welche in Kombination mit der TCR beta Kette V $\beta$ 5 SIINFEKL-beladene MHC-Moleküle erkennt. Die OT-I T-Zellen werden im Anschluss für 60-72 h bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> mit den Antigen beladenen DCs co-kultiviert. Nach Zugabe von Propidiumiodid zur Differenzierung zwischen toten und lebendigen Zellen und Kalibrationspartikeln („Sphero Blank calibration particles“) zur Normalisierung werden die Proben mittels Durchflusszytometrie vermessen.

**Tabelle 5-21: Proben für die T-Zell Proliferationsversuche an reifen Milz-DCs**

Polymer-Antikörper	Polymer	Antigen	CpG	Antikörper
<b>1: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx -aDEC205</b>	1	-	-	8
<b>2: Antigen</b>	-	1	-	-
<b>3: N<sub>3</sub>-PEtOx b-PiPrOx AF647-AG</b>	1	17	-	-
<b>4: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG</b>	1	17	12	
<b>5: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AG-aDEC205</b>	1	17	-	8
<b>6: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG-aDEC205</b>	1	17	12	8
<b>7: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AG-aCD11c</b>	1	17	-	8
<b>8: N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AG-CpG-aCD11c</b>	1	17	12	8

Im Gegensatz zu dem obigen T-Zell Proliferation Versuch wird diesmal die Zellteilung nicht anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin gemessen, sondern mit Hilfe eines violetten Proliferationsfarbstoffs („Cell Trace Violet“, Invitrogen). Dieser wird nach Eindringen in die Zelle von Esterasen zu einer stark fluoreszierenden Verbindung abgebaut und in den Zellen an Amine gebunden. Das Ausmaß der Zellteilung kann in Folge der gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffs auf die Tochterzellen mittels FACS-Analyse bestimmt werden (Anhang: Abbildung 8-26 und Abbildung 8-27).

Abbildung 5-73 zeigt die normalisierte Proliferation von CD8+ OT-I T-Zellen für die Proben 1-6 aus der obigen Tabelle bei einer Antigenkonzentration von  $c = 1 \cdot 10^{-9}$  M. Dies entspricht ungefähr der Menge, welche für die T-Zellproliferationsversuche an unreifen BMDCs (Abschnitt 5.4.9.1) verwendet wird. Diesmal dient anstelle des reinen N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste, das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-aDEC205 Konjugat als Negativkontrolle und induziert folglich keine T-Zell Proliferation. Alle weiteren Proben, welche Antigen enthalten, induzieren eine mehr oder weniger starke T-Zell Aktivierung. Deutlich erkennbar ist, dass die

beiden Konjugate, N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-aDEC205 Konjugat und noch mehr das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-CpG-aDEC205 Konjugat, welche spezifisch von CD8+ DCs gebunden bzw. internalisiert werden, wie zu erwarten die stärkste T-Zell Proliferation hervorrufen können.

Die aus den Vorläufern (N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-Antigen und N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-Antigen-CpG) induzierte T-Zell Proliferation ist jeweils ca. halb so stark. Somit hat der Antikörper und die damit verbundene rezeptorvermittelte Aufnahme einen entscheidenden Einfluss auf die CD8+-T-Zell Aktivierung.

Weiterhin fällt auf, dass das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-CpG Konjugat im Vergleich zum N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen Konjugat ebenfalls eine stärkere T-Zellproliferation hervorruft. Aus der Literatur ist bekannt, dass der DEC205-Rezeptor neben aDEC205 auch das CpG-ODN binden sowie internalisieren kann.<sup>[99]</sup> Demgegenüber kann gezeigt werden (Anhang Abbildung 8-22), dass das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG Konjugat nach 60 Minuten eine um den Faktor drei schlechtere totale Internalisation in CD8+ DCs im Vergleich zum N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-CpG-aDEC205 Konjugat zeigt. Demnach kann zwar eine T-Zell Proliferation induziert werden, die jedoch durch Anbindung des Antikörpers aDEC205 deutlich verstärkt wird.

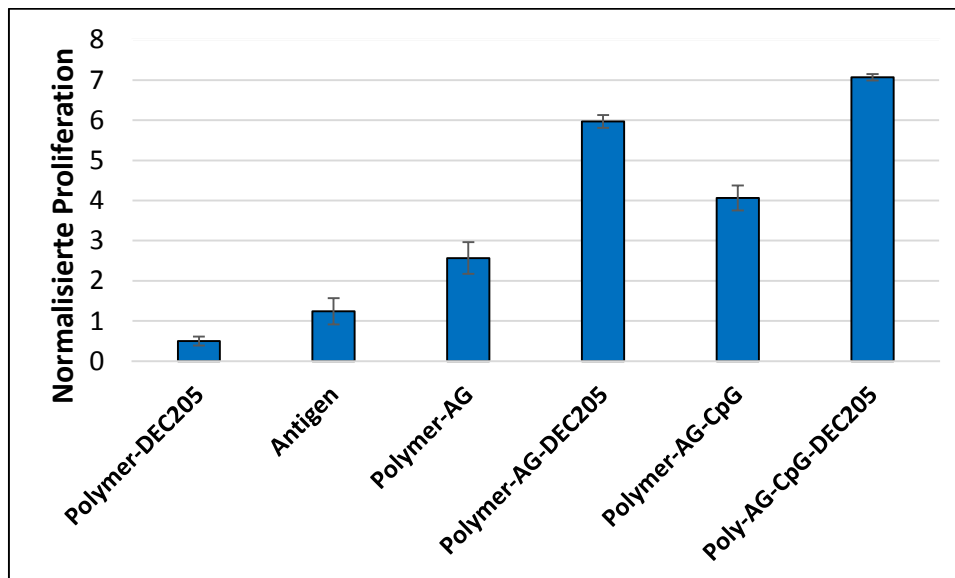


Abbildung 5-73: Antigenpräsentationsassay an reifen Milz-DCs vorinkubiert mit zylindrischen Polymerbürsten (45min) und OT-I CD8+ T-Zellen (60-72h); c(Antigen) = 1E-09 M ~ 2\*10<sup>12</sup> Partikel (Peptid) / 5\*10<sup>5</sup> DCs.

In Abbildung 5-74 ist noch einmal zum Vergleich die normalisierte Proliferation der CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen gegen die Antigenkonzentration aller zuvor gezeigten Proben aufgetragen. Mit zunehmender Antigenkonzentration kann für alle Antigen enthaltenden Proben wie zu erwarten letztlich immer eine Zunahme der T-Zell Proliferation beobachtet werden. Für die Konjugate, welche aber CpG, aDEC205 oder beides enthalten, wird jedoch ein Maximum bereits schon bei einer Antigenkonzentration von  $c = 1 \cdot 10^{-8}$  M erhalten. Bei höheren Konzentrationen wird für diese Proben einen Abfall der T-Zell Proliferation beobachtet. Dieses Verhalten kann wie folgt erklärt werden: Die Stimulierung von T-Zellen läuft für mehrere Tage in einem statischem System ab, z.B. Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Während dieser Zeit wird in der Regel kein Mediumwechsel vorgenommen. Das heißt, dass der Vorrat an Nährstoffen begrenzt ist. Wenn die T-Zellen sehr stark proliferieren, kann es sein, dass die Nährstoffe weitgehend aufgebraucht sind (z.B. an Tag 2 der Kultur), bevor das Ausmaß der Zellproliferation (z.B. an Tag 3) gemessen wird. In diesem Falle wäre die Teilungsrates der T-Zellen von Tag 2 auf Tag 3 unter Umständen niedriger, als in einer Parallelkultur, bei der die T-Zellen zwar schwächer proliferieren, aber die Nährstoffe (noch) nicht aufgebraucht sind.

Weiterhin fällt auf, dass bei sehr hoher Antigenkonzentration das reine Antigen (violett) sowie das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen Konjugat (pink), trotz Herunterregulierung der unspezifischen Zellaufnahme eine starke Proliferation induzieren kann. Mögliche Begründungen könnten sein, dass die DCs noch nicht vollständig ausgereift waren oder die unspezifische Zellaufnahme nach Ausreifung nicht komplett herunterreguliert wird. Und somit das in sehr hoher Konzentration vorliegende Antigen unspezifisch aufgenommen, prozessiert und präsentiert wird.



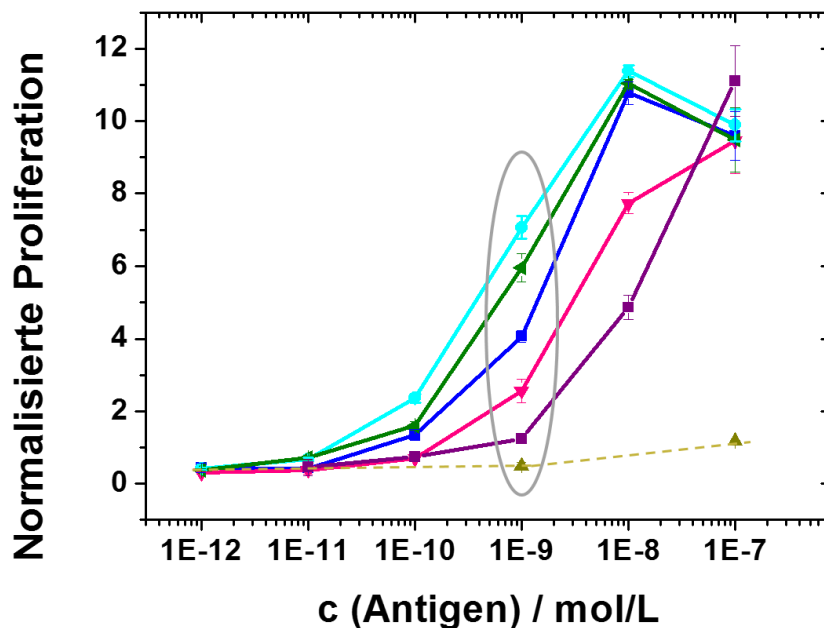


Abbildung 5-74: Antigenpräsentationsassay an reifen Milz-DCs ( $2.5 \cdot 10^4$ ) inkubiert mit zylindrischen Polymerbürsten-Konjugaten/Antigen und OT-I CD8+ T-Zellen ( $5 \cdot 10^4$ ): ▲  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205; ■ Antigen; ▼  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen; ■  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG; ◄  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aDEC205; ●  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG-aDEC205; ○  $1E-09$  M Antigen, entspricht der Antigenkonzentration für die Versuche an unreifen DC (Abbildung 5-72).

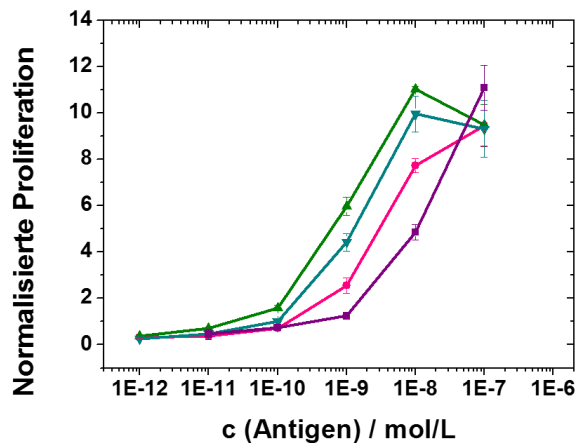
Des Weiteren werden Konjugate mit dem Antikörper aCD11c anstelle von aDEC205 synthetisiert und im gleichen Experiment wie die zuvor gezeigten Proben hinsichtlich ihrem Vermögen zur T-Zell Aktivierung analysiert (Tabelle 5-21, Probe 7 und 8).

Zum Vergleich ist in Abbildung 5-75 (links: Konjugate ohne CpG; rechts: Konjugate mit CpG) die normalisierte T-Zell Proliferation bei verschiedenen Antigenkonzentrationen für das reine Antigen, das  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-(CpG), das  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-(CpG)-aDEC205 und neu hinzugekommen für das  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-(CpG)-aCD11c Konjugat aufgetragen. Wie bereits zuvor erwähnt, nimmt die T-Zell Proliferation mit zunehmender Antigenkonzentration zu. Auch hier wird durch die Anbindung von aCD11c eine stärkere T-Zell Aktivierung im Vergleich zum  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-Antigen Vorläufer ausgelöst.

Der direkte Vergleich der beiden  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-Antikörper Konjugate zeigt eine etwas stärkere T-Zell Aktivierung des  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-aDEC205 Konjugats gegenüber dem  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-aCD11c Konjugat. Die Unterschiede der T-Zell Proliferation der beiden  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-Antigen-Antikörper Konjugate lassen sich durch die Eigenschaften der beiden Antikörper erklären.

Der Antikörper aDEC205 bindet spezifisch an CD8+ DCs. Hingegen gilt CD11c als Universalmarker für DCs. Somit ist der Antikörper aCD11c weniger spezifisch als aDEC205 (vgl Abschnitt 5.4.3).<sup>[165]</sup> Zudem wird in Abschnitt 5.4.3 gezeigt, dass das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-aCD11c-Konjugat viel langsamer als das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten-aDEC205 Konjugat von DCs aufgenommen wird. Da jedoch der CD11c Rezeptor im Vergleich zum DEC205 Rezeptor viel stärker exprimiert wird, fällt jedoch die totale Internalisierung in die Zellen und die daraus resultierende Antigenpräsentation mit folgender T-Zellproliferation ähnlich hoch aus (vgl. Anhang Abbildung 8-22 ).

a



b

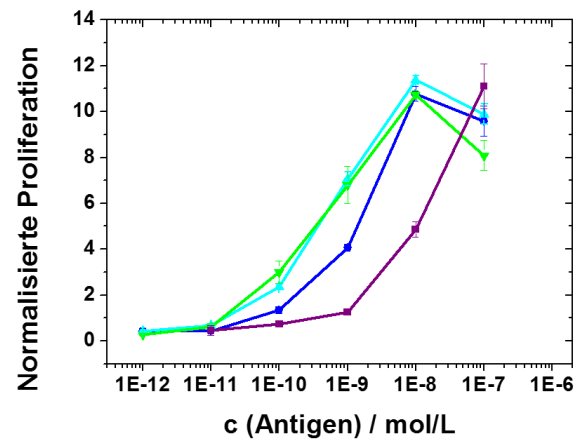


Abbildung 5-75: Antigenpräsentationsassay an reifen Milz-DCs ( $2.5 \cdot 10^4$ ) inkubiert mit zylindrischen Polymerbürsten-Konjugaten/Antigen und OT-I CD8+ T-Zellen ( $5 \cdot 10^4$ ): a) ▲ N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aDEC205; ▼ N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aCD11c; ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen; ■ Antigen; b) ▲ N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG-aDEC205; ▼ N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG-aCD11c; ● N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG; ■ Antigen

### 5.4.9.3 Zusammenfassung

Es wurde für alle Konjugate eine mehr oder weniger starke T-Zell Proliferation erhalten. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass dendritische Zellen, welche über endozytotische Lektin Rezeptoren wie den DC-SIGN oder DEC205 mittels monoklonaler Antikörper-Antigen-PLGA-NP Konjugate adressiert werden, eine starke CD8+ T-Zell Antwort induzieren.<sup>[70, 174, 175]</sup> Dies deutet somit darauf hin, dass Antigene, welche rezeptorvermittelt aufgenommen werden, möglicherweise nach endosomalem „Escape“ ins Zytoplasma gelangen und schließlich auch in MHC-I Komplexe eingebaut und über diese präsentiert werden könnten (Kreuz-präsentation“).<sup>[31,174, 176]</sup>

Weiterhin wurde in der Literatur gefunden, dass der Antikörper aDEC205 nach Internalisierung in die Zelle im späten Endosom, einem Zellkompartiment mit einer supoptimalen MHC-I Präsentation, wiederzufinden ist.<sup>[161, 169]</sup> Das Ergebnis der supoptimalen MHC-I Präsentation konnte nicht bestätigt werden.

Unsere Experimente dagegen zeigten, dass das Ausmaß der Proliferation für die Konjugate, welche mit Hilfe von aDEC205 gezielt an die CD8<sup>+</sup> DCs binden und schließlich mittels rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen werden, viel stärker ist als für die Konjugate ohne Antikörper. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Anbindung von CpG die T-Zell Proliferation noch einmal verstärkt wird. Dies kann zum einem durch die in Kapitel 5.4.7 gezeigte erhöhte unspezifische Zellaufnahme und zum anderen durch das Zusammentreffen des CpGs mit dem TLR9-Ligand in der Zelle erklärt werden. Letzteres führt zur weiteren Ausreifung der DCs (Aufregulation von MHC-Molekülen, Kostimulatorischen und [pro-] inflammatorischen Zytokinen), wodurch antigenspezifische T-Zellen stark aktiviert werden.

## 5.5 Biodistribution der Poly(2-oxazolin)bürsten

Für die Anwendung im menschlichen Körper muss neben dem Aggregationsverhalten in humanem Serum auch noch die Zelltoxizität dieser vielversprechenden Systeme untersucht werden. So darf die Aufnahme der Polymere zu keiner Schädigung der Zellen führen.

### 5.5.1 MTT-Toxizitätstest

Die MTT-Toxizitätstests werden von Dr. [REDACTED] (Institut für Dermatologie der Uniklinik Mainz) durchgeführt (siehe Abschnitt 7.13-Toxizitätstest). Es wird die Überlebensrate von zwei verschiedenen Zelllinien, dendritischen Knochenmarkzellen (BMDC) sowie menschlichen embryonalen Nierenzellen (engl. „human embryonic kidney 293 cells“ = HEK293) in der Anwesenheit von Poly(2-oxazolin)bürsten untersucht. Hierzu werden die Polymere in verschiedenen Konzentrationen zu den jeweiligen Zellen gegeben und deren Überlebensrate wird auf die Überlebensrate nicht behandelter Zellen normiert und im Anschluss gemittelt. Die aus zwei für BMDCs und drei für HEK293 unabhängigen Experimenten erhaltenen Ergebnisse der Zellüberlebensrate sind in Abbildung 76 zusammengefasst. Die Zellviabilität liegt bei sehr hohen getesteten Polymerkonzentrationen (1g/L) für HEK293 bei über 60% bzw. 74% und bei BMDCs sogar über 74% bzw. 77 %. Somit wird noch einmal die Eignung dieser Polymerbürsten als „Nanocarrier“ bestärkt.

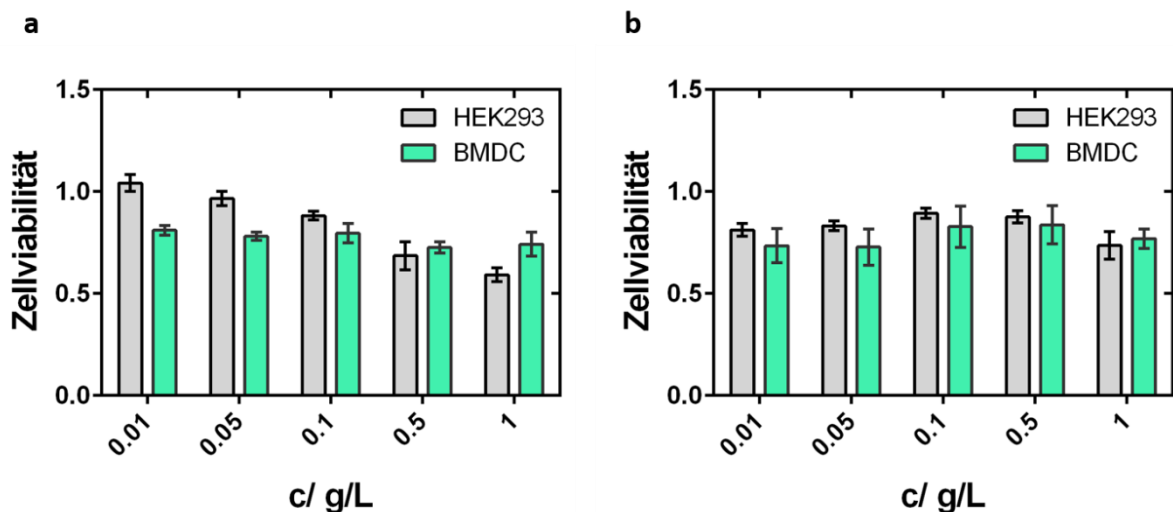


Abbildung 5-76: MTT-Test an --- HEK293 und --- BMDC für (a) N<sub>3</sub>-PiPrOx und (b) N<sub>3</sub>-PEtOX-b-PiPrOx

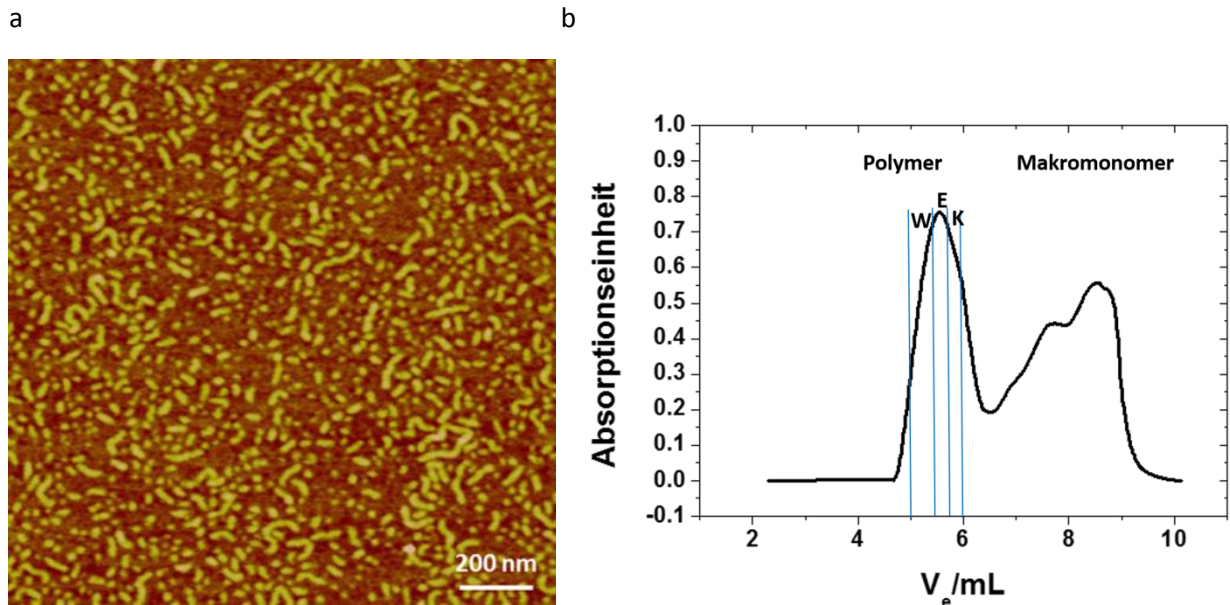
### 5.5.2 Fraktionierung der Poly(2-oxazolin)bürsten

Wie zuvor gezeigt, weisen die von [REDACTED] synthetisierten Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten ein hohes Potential auf, als polymere Trägersysteme für die Krebsimmuntherapie Anwendung zu finden.

Allerdings besitzen sie eine breite Molekulargewichtsverteilung mit Polydispersitäten von  $PDI = 1,7 - 2,4$ . Somit kann keine klare Aussage getroffen werden, ob die in Abschnitt 5.4 gezeigte Konjugation des Antigens sowie des Antikörpers vorwiegend an den bürstenartigen Topologien oder anderen Strukturen (ellipsoide- und kugelförmige Strukturen), die bei dieser breiten Molekulargewichtsverteilung vorliegen, erfolgt. Weiterhin soll untersucht werden, ob es Unterschiede der verschiedenen Topologien bezüglich der Zellaufnahme oder Bioverteilung gibt, sofern es für die Konjugation keinen Unterschied gibt.

Dafür müssen als erstes die Polymerbürsten fraktioniert und im Anschluss auf Biokonjugation, Zellaufnahme und Bioverteilung untersucht werden. Im folgenden Abschnitt ist als erstes die Fraktionierung mittels HFIP-GPC und die anschließende Charakterisierung mittels Lichtstreuung am Beispiel der  $N_3$ -PEtOx-Bürste gezeigt.

In der AFM-Aufnahme der unfraktionierten  $N_3$ -PEtOx-Bürste sind neben wurmartigen Strukturen eine Vielzahl an ellipsoidförmigen und kugelförmigen Molekülen erkennbar (Abbildung 5-77-a). Dieses Ergebnis wird durch das Gelpermeationschromatogramm (Abbildung 5-77-b) bestätigt. Dies zeigt eine breite Verteilung mit einem „Tailing“ nach kleinen Molmassen.



**Abbildung 5-77: (a) AFM-Höhenbild (trocken) der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste nach spin coating aus wässriger Lösung auf Mica; c = 0.1 g/L; (b) Gelpermeationschromatogramm der unfraktionierten N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste (W = wurmartige Polymerbürste; E = Ellipsoide; K = Kugeln) in HFIP.**

In Abbildung 5-78 sind die Elutionschromatogramme der drei erhaltenen Fraktionen nach präparativer Aufreinigung mittels HFIP-GPC dargestellt. Es werden drei Peaks mit unterschiedlicher Elutionszeit und demzufolge drei verschiedene Fraktionen erhalten. Die schwarze Kurve zeigt die hochmolekularen wurmartigen Polymerbürsten, die rote Kurve die ellipsoidartigen Polymerbürsten und die blaue Kurve steht für die niedermolekularen kugelförmigen Moleküle. Da es keinen Vergleichsstandard für die Polymerbürsten gibt, können anhand der GPC-Messungen keine genauen Aussagen über die Molekulargewichte der einzelnen Polymerfraktionen gemacht werden. Sie dient lediglich zur qualitativen Veranschaulichung und zur Analyse der Polydispersität.

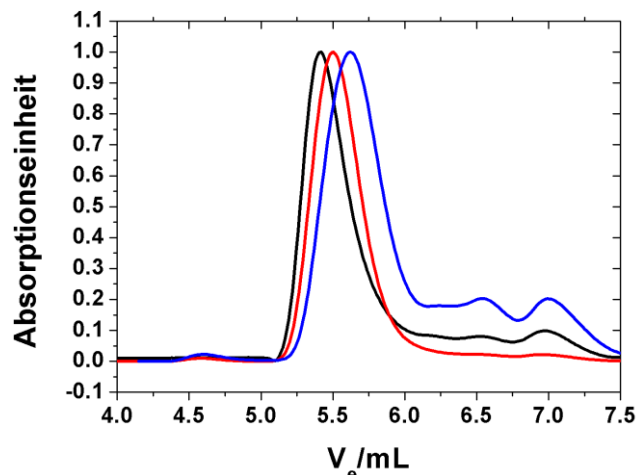


Abbildung 5-78: Gelpermeationschromatogramme der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste in HFIP: --- wurmartige Bürstenfraktion (W), --- Ellipsoidfraktion (E), --- Kugelfraktion (K).

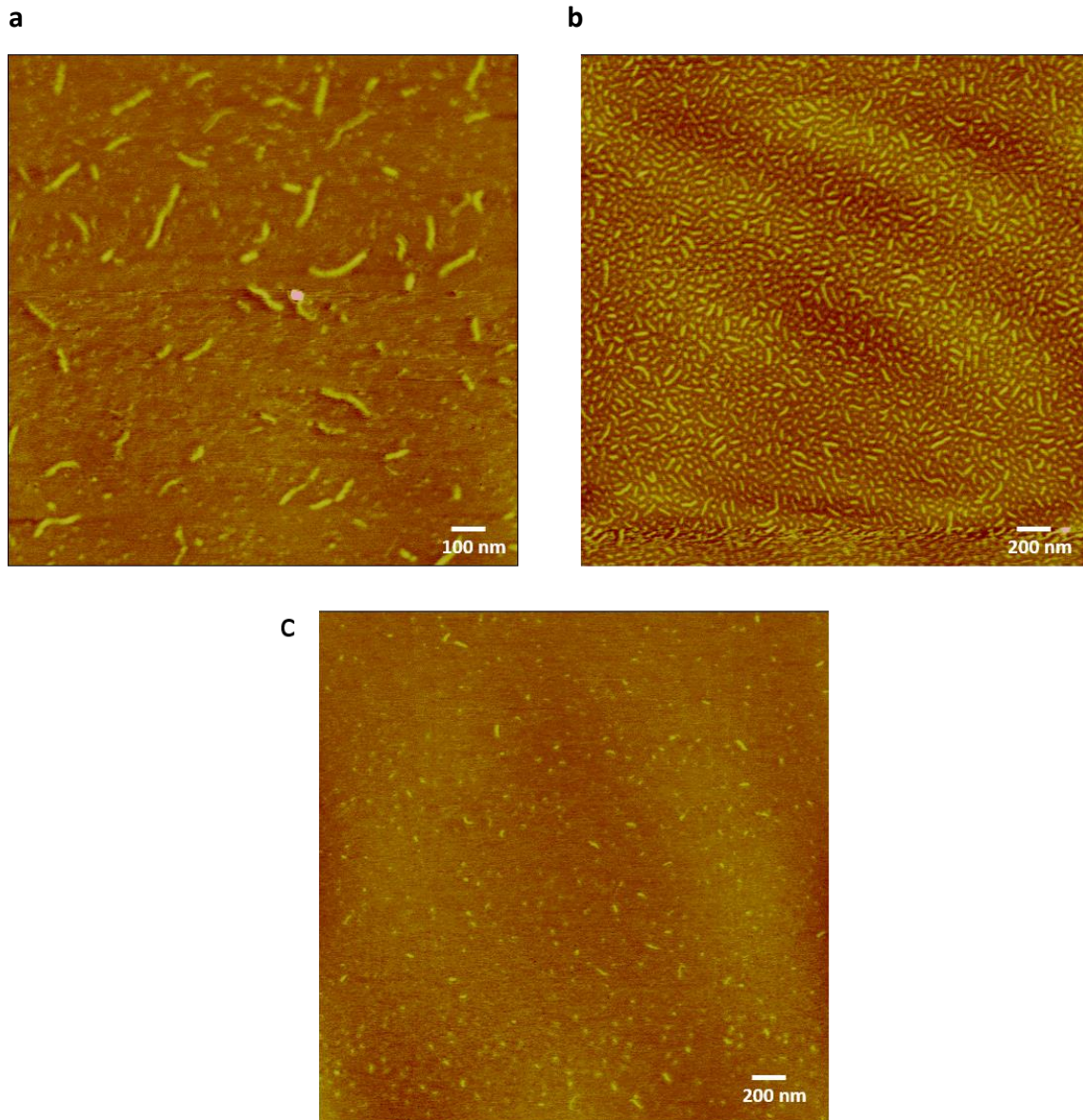
Um eine quantitative Aussage über die Größe sowie über das Molekulargewicht treffen zu können, werden die einzelnen Fraktionen mittels SLS und DLS vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5-22 aufgeführt.

Tabelle 5-22: Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste in Methanol mit 5mM Lithiumbromid, Filter: LCR 450 nm.

Probe	$M_w/g \cdot mol^{-1}$	$R_h/nm$	$R_g/nm$	$\rho(R_g/R_h)$
Wurm-(W)	$2 \cdot 10^6$	31.5	40.0	1.3
Ellipsoid-(E)	$7 \cdot 10^5$	17.0	21.0	1.23
Kugel-(K)	$3 \cdot 10^5$	12.0	-	-

Für die wurmartige Polymerbürste wird ein Molekulargewicht von  $M_w = 2.000.000$  g/mol, für die Ellipsoidstruktur von  $M_w = 700.000$  g/mol und für die kugelartige Struktur von  $M_w = 300.000$  g/mol erhalten. Die aus der dynamischen Lichtstreuung ermittelten hydrodynamischen Radien betragen ausgehend von der Kugelfraktion hin zur wurmartigen Polymerbürste  $R_h = 12$  nm;  $R_h = 17$  nm und  $R_h = 31,5$  nm. Die AFM-Aufnahmen der drei Polymerfraktionen stimmen qualitativ sehr gut mit den aus der SLS und DLS erhaltenen Ergebnissen überein (Abbildung 5-79). Für die Polymerbürste mit dem größten Molekulargewicht sind wurmartige Bürstenstrukturen mit großer Konturlänge zu sehen, welche allerdings immer noch etwas polydispers sind (Abbildung 5-79-a). Die Ellipsoidstruktur ist in Abbildung 5-79-b zu erkennen. Auffällig ist in Abbildung 5-79-c, dass neben der Kugelfraktion auch noch wenige Ellipsoidstrukturen sichtbar sind und somit auch nach

Fraktionierung keine 100% reine Kugelfraktion erhalten wird. Angesichts dessen, dass jedoch der Großteil der Fraktion aus kugelartigen Molekülen besteht, werden die noch wenigen Ellipsoide vernachlässigt.



**Abbildung 5-79: AFM-Höhenbilder (trocken) der verschiedenen Fraktionen der Poly-N<sub>3</sub>-EtOx-Bürste nach spin coating aus wässriger Lösung auf Mica; c = 0.1 g/L: (a) wurmartige Bürstenfraktion (W), (b) Ellipsoidfraktion (E) und (c) Kugelfraktion (K).**

### 5.5.3 Biodistribution der verschiedenen Poly(2-oxazolin)-Fraktionen

Nach erfolgreicher Fraktionierung werden die drei erhaltenen Strukturen mittels des NIR-Farbstoffs CW800 fluoreszenzmarkiert (siehe Abschnitt 7.5.3.5) und im Hinblick auf ihre zeitabhängige Biodistribution und Blutzirkulationszeit von [REDACTED] (Translationale

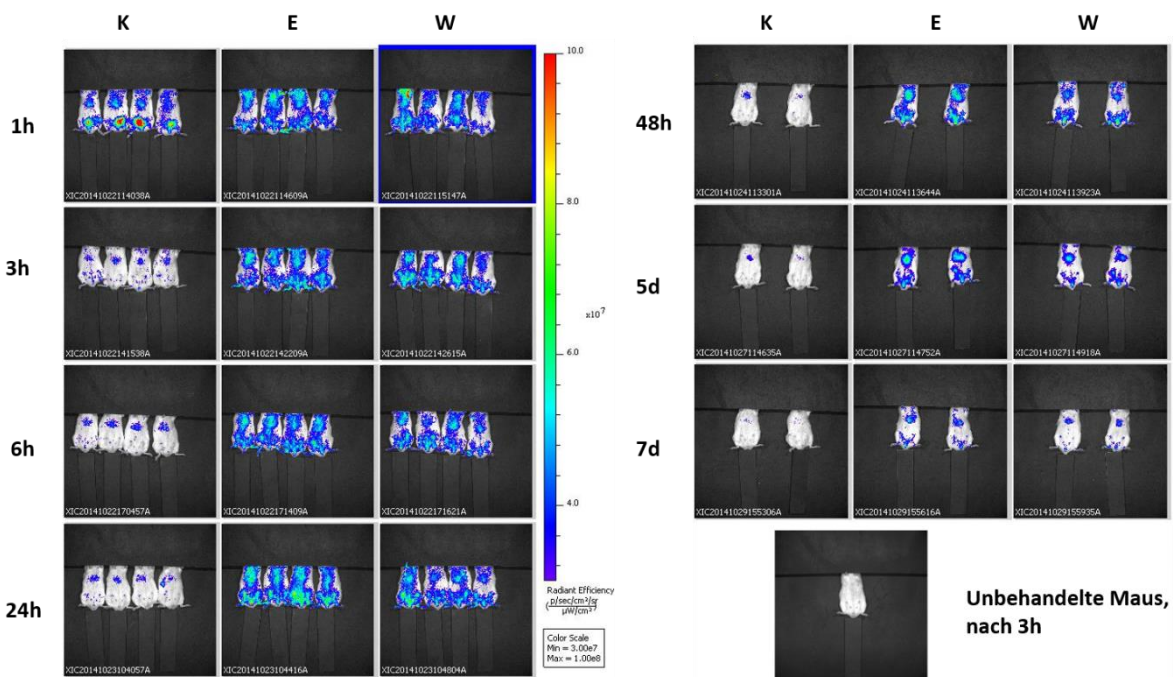


Onkologie an der Universitätsmedizin Mainz) untersucht. Hierzu werden jeweils 150  $\mu\text{L}$  ( $3.75 \cdot 10^{-6}$  M Farbstoffkonzentration =  $\sim 1.25 \cdot 10^{-6}$  M Polymerkonzentration) CW800 markiertes Polymer retroorbital in die Maus injiziert. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt nach verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 5-80). Genauere Angaben zur Durchführung der Messungen zur Biodistribution und Blutzirkulation befinden sich im Abschnitt 7.13 – „*in vivo* Imaging“.

Eine Stunde nach Injektion zeigen alle drei Polymerfraktionen eine sehr gute Biodistribution, wobei sich die Kugelfraktion erwartungsgemäß vorwiegend in der Blase anreichert. Des Weiteren werden die kugelförmigen Moleküle sehr schnell ausgeschieden, so dass nach 6 h lediglich ein geringes Fluoreszenzsignal im Bereich der Leber zu detektieren ist.

Die ellipsoiden Strukturen sowie die wurmartigen Polymere zeigen noch bis zu 48 h (bzw. 5 Tagen) eine Verteilung im gesamten Körper der Maus. Das Fluoreszenzsignal nimmt mit zunehmender Zeit ab. Dennoch ist sieben Tage nach Injektion immer noch ein Fluoreszenzsignal in den Mäusen vorhanden.

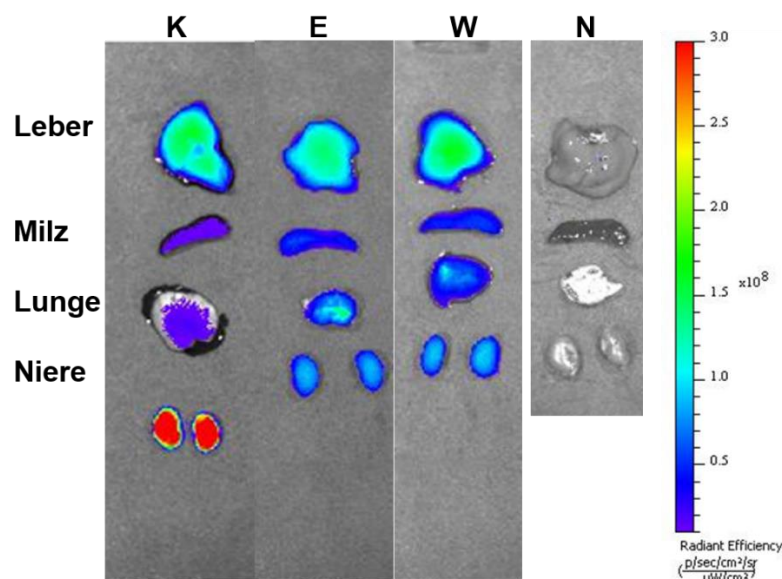
Des Weiteren wird mit zunehmender Zeit für alle drei Topologien primär ein Signal in der Leber beobachtet.



**Abbildung 5-80: Zeitabhängige Biodistribution der verschiedenen Fraktionen der  $\text{N}_3$ -PETox-Bürste (Kugelfraktion –(K); Ellipsoidfraktion – (E); Wurmartige Bürste – (W)) nach IV-Injektion in BALB/c Mäusen. Es werden jeweils 150  $\mu\text{L}$  einer 1.25  $\mu\text{M}$  Polymerlösung (3.75  $\mu\text{M}$  CW800-IR-Farbstoff) retroorbital der Maus injiziert.**

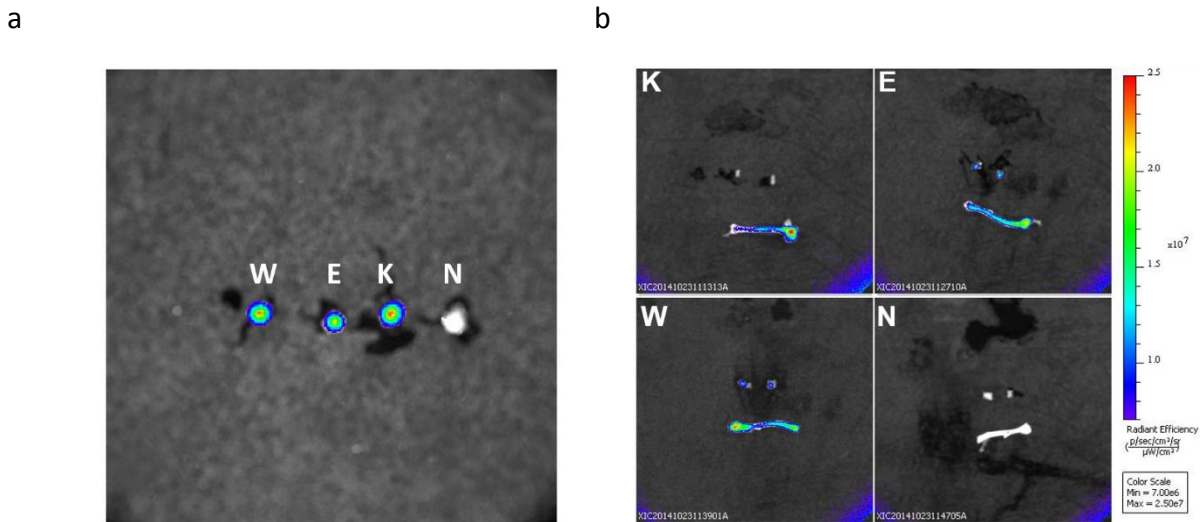
Für die *ex vivo* Organaufnahmen werden die Mäuse 24 h sowie 7 Tage nach Injektion getötet und bezüglich ihrer Polymeraufnahme untersucht. Neben den Organen (Lunge, Leber, Milz, Niere) werden auch die Lymphknoten sowie die Knochen kontrolliert.

In Abbildung 5-81 sind die Organe 24 h nach Injektion sowie die unbehandelten Organe gezeigt. Alle Polymerfraktionen zeigen ein Fluoreszenzsignal in allen Organen. Die kugelartigen Moleküle zeigen wegen ihrer erhöhten renalen Ausscheidung durch ihr geringes Molekulargewicht die stärkste Akkumulation in der Niere. Die beiden anderen Fraktionen (Ellipsoidartige- und wurmartige Polymere) reichern sich vor allem in der Leber an.



**Abbildung 5-81:** *Ex vivo* Organaufnahmen der verschiedenen Fraktionen der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste (Kugelfraktion –(K); Ellipsoidfraktion – (E); Wurmartige Bürste – (W)) nach 24 h in BALB/c Mäusen; Retroorbitale Injektion. Es wurden jeweils 150 µL einer 1.25 µM Polymerlösung (3.75 µM CW800-IR-Farbstoff) injiziert. Die jeweils mit N gekennzeichneten Organe dienen als Kontrollen.

Nach einem Zeitraum von 7 Tagen zeigen ebenfalls die Kugeln im Vergleich zu den beiden anderen Fraktionen ein verstärktes Fluoreszenzsignal in der Niere. Weiterhin können alle Fraktionen in allen Organen detektiert werden, jedoch mit verminderter Fluoreszenz (siehe Anhang: Abbildung 8-30). Des Weiteren zeigen alle Fraktionen, 24 h (siehe Abbildung 5-82) sowie 7 Tage (siehe Anhang: Abbildung 8-31) nach Injektion, eine Anreicherung in den Knochen und in den Lymphknoten.



**Abbildung 5-82:** Anreicherung der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste-CW800 (Wurmartige Bürste – (W); Ellipsoidfraktion – (E); Kugelfraktion –(K)) in den Lymphknoten und Knochen von BALB/c Mäusen nach 24 h; Subkutane Injektion; Es wurden jeweils 50  $\mu$ L einer 1.87  $\mu$ M Polymerlösung (3.75  $\mu$ M CW800-IR-Farbstoff) in den Fuß der Maus (a) bzw. retroorbital (b) injiziert. Der mit N gekennzeichnete Lymphknoten ist eine Kontrolle.

In Abbildung 5-83 sind die Blutzirkulationszeiten der drei verschiedenen Fraktionen nach retroorbitaler Injektion dargestellt. Die Bestimmung des Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgt, wie in Abschnitt 7.13 beschrieben, *ex vivo*. In einem Zeitraum von 15 min nach Injektion zeigen die kugelförmigen Moleküle (rot) ein um die Hälfte reduziertes Fluoreszenzsignal im Blut, sodass sich noch circa 50% der Moleküle im Blutkreislauf befinden. Von den ellipsoidartigen Molekülen (grün) befinden sich circa 75% und von den wurmartigen Polymeren (blau) circa 60% im Blutkreislauf. Nach einen Zeitraum von 6 h hat sich das Fluoreszenzsignal der Kugeln deutlich verringert, wohingegen das Signal der beiden anderen Strukturen fast gleich geblieben ist. Nach 24 h ist kein Fluoreszenzsignal der Kugeln im Blut nachweisbar. Dahingegen lässt sich noch nach 48 h ein Fluoreszenzsignal für die Ellipsoide sowie wurmartigen Polymere detektieren, welches nach 5 Tagen verschwindet.

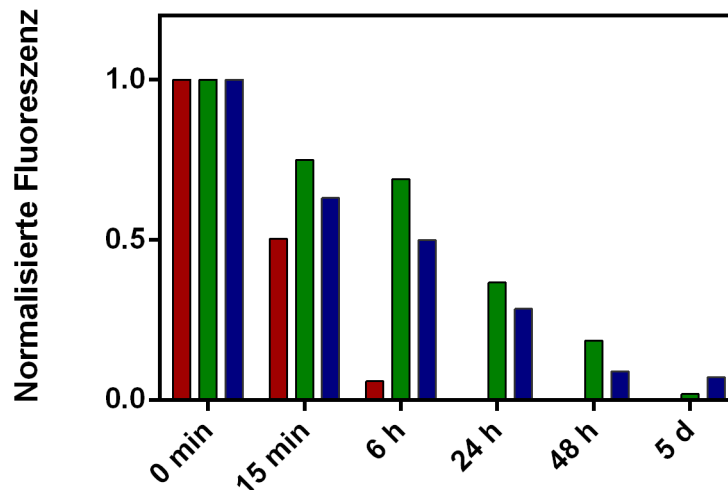


Abbildung 5-83: Blutzirkulationszeiten der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -EtOx-Bürste (--- Kugelfraktion (K); --- Ellipsoidfraktion; --- Wurmartige Bürste (W) nach Injektion in BALB/c Mäusen. Es werden jeweils 150  $\mu\text{L}$  einer 1.87  $\mu\text{M}$  Polymerlösung (3.75  $\mu\text{M}$  CW800-IR-Farbstoff) retroorbital injiziert und jeweils 50  $\mu\text{L}$  Blut nach den jeweiligen Zeitpunkten zur Messung entnommen. Die Bestimmung zum Zeitpunkt  $t = 0$  min erfolgt *ex vivo* (vgl. Abschnitt 7.13).

Zur Bestimmung der Halbwertszeit im Blut wird auf den Wert des Fluoreszenzsignals 15 min nach Injektion normiert. Die höchste Halbwertszeit mit einem Wert von  $t_{1/2} = 23.6$  h wird für die Ellipsoidfraktion (grün) erhalten. Die wurmartige Polymerbürste (blau) weist eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 15.8$  h und die Kugelfraktion (rot) von  $t_{1/2} = 2.7$  h auf.

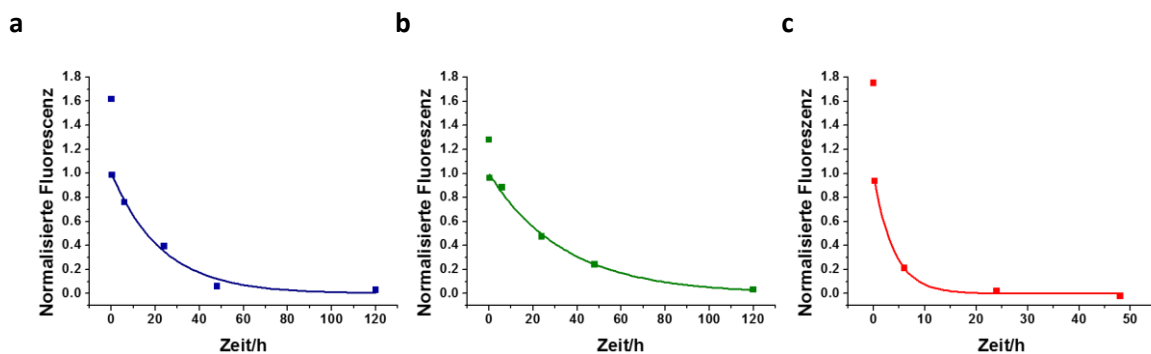


Abbildung 5-84: Blutzirkulationszeiten der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste (a) --- Wurmartige Bürste (W); (b) --- Ellipsoidfraktion (E); (c) --- Kugelfraktion (K) nach Injektion in BALB/c Mäusen. Es werden jeweils 150  $\mu\text{L}$  einer 1.25  $\mu\text{M}$  Polymerlösung (3.75  $\mu\text{M}$  CW800-IR-Farbstoff) retroorbital injiziert und jeweils 50  $\mu\text{L}$  Blut nach den jeweiligen Zeiten zur Messung entnommen. Die Bestimmung zum Zeitpunkt  $t = 0$  min erfolgt *ex vivo* (vgl. Abschnitt 7.13); Zur Bestimmung der Halbwertszeit im Blut wird auf den Wert 15 min nach Injektion normiert.

#### 5.5.4 Zusammenfassung

Mittels HFIP-GPC gelang es, die N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürsten zu fraktionieren. Es wurden folgende drei Polymerfraktionen erhalten:

- Hochmolekulare wurmartige Polymerbürsten
- Ellipsoidartige Polymerbürsten
- Niedermolekulare kugelförmige Moleküle

Die Versuche zur Biodistribution zeigten eine Stunde nach Injektion für alle drei Polymerfraktionen eine breite Körperverteilung in den Mäusen. Mit zunehmender Zeit (bis zu 5 Tagen) war hingegen die Kugelfraktion weitgehend ausgeschieden, während die ellipsoidartigen und wurmartigen Polymerbürsten immer noch detektiert werden konnten. Alle drei Polymerfraktionen wurden in Lunge, Leber, Niere, Milz sowie in den Knochen und Lymphknoten detektiert. Durch ihre rasche Ausscheidung zeigten jedoch die kugelförmigen Moleküle die stärkste Anreicherung in der Niere.

Die Untersuchung der Blutzirkulationszeiten ergab, dass 24h nach Injektion die Kugeln vollständig aus dem Blutkreislauf verschwunden sind. Im Gegensatz dazu konnte noch 48 h nach Injektion ein Fluoreszenzsignal für die ellipsoidartigen sowie wurmartigen Polymere detektiert werden, da sie sich auf Grund ihrer Topologie der renalen Filtration entziehen konnten.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese und Charakterisierung verschiedener Polymer-Wirkstoff-Antikörper Konjugate für die Anwendung in der Krebsimmuntherapie vorgestellt.

Erstes Ziel der Arbeit war es, geeignete polymere Trägersysteme für die *in vivo* Anwendung zu finden. Als Auswahlkriterien gelten hier eine möglichst lange Blutzirkulationszeit, Stabilität gegenüber Aggregation in humanem Blutserum sowie die Unterbindung einer unspezifischen Zellaufnahme. Hierzu wurden verschiedene polymere Trägersysteme zunächst hinsichtlich ihrer Stabilität in humanem Serum untersucht, wobei die von Rausch et al. entwickelte Methode mittels dynamischer Lichtstreuung zum Einsatz kam.<sup>[144]</sup>

Das von Nuhn et al. etablierte kationische Nanohydrogelsystem zum Transport von siRNA bildete in Serum, Albumin (BSA) und in einer anionischen Proteinfraction aufgrund von Ladungseffekten Aggregate in der Größenordnung von  $R_h = 200 - 300$  nm. Durch Einstellung des optimalen Partikel siRNA Verhältnisses konnten die nahezu neutralen Partikel mit einem Verhältnis von NP:siRNA 25:1 gegenüber Aggregation stabilisiert werden.<sup>[140]</sup>

Das von Reuter et al. synthetisierte Polymer-Wirkstoff-Antikörper Konjugat, bei welchem PLL bzw. die PLL-Bürste als Trägersystem verwendet wurde, zeigte aufgrund der hohen positiven Ladung Aggregatbildung in Serum und zugleich eine sehr hohe unspezifische Aufnahme in dendritische Zellen (DCs).<sup>[8]</sup>

Sukzessive Absättigung der kationischen Ladung durch Succinylierung erlaubte die Stabilisierung des linearen PLL-Systems gegenüber Aggregation sowie die fast vollständige Unterdrückung der unspezifischen Aufnahme in DCs. Es wurden fünf verschiedene Succinylierungsgrade (37%, 49%, 60%, 70% und 100%) eingestellt, welche mittels TNBSA-Assay und H-NMR quantifiziert wurden.

Da für die Bürstenstrukturen eine längere Blutzirkulationszeit und demzufolge eine bessere Bioverfügbarkeit vermutet wird, wurde das Succinylierungskonzept auf die PLL-Bürste übertragen.<sup>[69,115,116]</sup> Diesmal konnte kein nach außen hin völlig elektroneutrales Polymer erhalten werden. Demzufolge bildeten alle drei Polymere Aggregate in humanem Serum.

Darüber hinaus wurden noch zwei weitere in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] synthetisierte Polymerklassen hinsichtlich ihrer Eignung als „Nanocarrier“ überprüft.

ELP-Bürsten mit endständigen Carboxygruppen führten zur Aggregation in humanem Serum. ELP-Bürsten, bei denen 90% der Carboxygruppen in neutrale PEG-Azidgruppen überführt wurden, ergaben eine verminderte Aggregation mit Serumproteinen. Jedoch wurden diese aufgrund ihrer für Zellexperimente zu geringen Übergangstemperatur von  $T = 27\text{ °C}$  verworfen.

Für die Poly(2-oxazolin)-Bürsten wurden folgende Beobachtungen gemacht: Die  $N_3$ -PiPrOx-Bürsten bildeten aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Polymer und hydrophoben Serumproteinen Aggregate in humanem Serum. Zudem wurden diese unspezifisch von DCs aufgenommen. Die beiden hydrophileren  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürsten und  $N_3$ -PEtOx-Bürsten bildeten keine Aggregate in humanem Serum und zeigten keine unspezifische Zellaufnahme. Des Weiteren wurde keine bemerkenswerte Zelltoxizität beobachtet. Demnach eignen sich diese polymeren Trägersysteme ideal als Vakzine-Carrier.

Zur spezifischen Adressierung von CD8+ DCs wurde der Antikörper aDEC205 ausgewählt. Die Konjugation erfolgte über kupferfreie Click-Chemie. Hierzu bedarf es eines DIBO-modifizierten Antikörpers aDEC205. Mit der Wahl einer optimierten Aufarbeitungsmethodik gelang es, aggregatfreie, unimere DIBO-modifizierte aDEC205 Antikörper zu isolieren. Diese konnten mittels DLS detektiert werden. Weiterhin konnten 3-4 AlexaFluor647 Farbstoffmoleküle über die Lysingruppen des Antikörpers aDEC205 angebunden werden, der Nachweis erfolgte über UV-VIS und FCS.

Zunächst wurde die Synthese und Charakterisierung der Konjugate an den verschiedenen (succ)-PLLs getestet. Hierzu wurden als erstes die PLLs Azid-funktionalisiert und anschließend mit DIBO-modifiziertem aDEC205 umgesetzt. In der FCS wurden jeweils große Mengen freier Antikörper aDEC205 detektiert. Die FCS Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den Zellaufnahmestudien, welche eine Kolokalisation beider Farbstoffe und demnach einen Hinweis auf erfolgreiche Konjugation geben. Aufgrund dieser Widersprüche und der nicht Reproduzierbarkeit wurde mit diesem System nicht mehr weitergearbeitet.

Im Gegensatz dazu konnte die Anbindung des Antikörpers aDEC205 an die  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste zweifelsfrei mit Hilfe mehrerer Charakterisierungsmethoden wie UV-VIS, GPC, SDS-PAGE, FCS (FCCS), DLS, FACS und CLSM bewiesen werden. Nach erfolgreicher

Aufreinigung konnte kein freier Antikörper detektiert werden. Die FCS und DLS ergaben für das Konjugat einen hydrodynamischen Radius von  $R_h = 38$  nm. In humanem Serum wurden auch schon wie für das reine Polymer keine Aggregate detektiert. FACS- und CLSM-Messungen zeigten eine eindeutige Aufnahme des Konjugats in CD8<sup>+</sup> DCs, wohingegen in CD8<sup>-</sup> DCs sowie nicht-DCs keine Aufnahme zu beobachten war. Die rezeptorvermittelte Zellaufnahme in CD8<sup>+</sup> DCs wurde anhand eines Blockierungsversuchs mit Hilfe von nativem aDEC205 bestätigt. Ein weiterer Beweis lieferte die Aufnahme des Konjugats in reife DCs.

Studien zur Internalisierungskinetik zeigten für das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205 Konjugat eine schnelle und hohe Aufnahme in CD8<sup>+</sup> DCs. Im Gegensatz dazu wurde für das N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-aCD11c-Konjugat, trotz stärkerer Zellanbindung, eine viel geringere und langsamere Internalisierung in CD8<sup>+</sup> DCs erhalten.

Zur Synthese des Vollkonjugats wurde aus sterischen Gründen zuerst das tumorassoziierte Modell-Antigen SIINFEKL sowie der immunaktivierende TLR9-Ligand CpG1826 über kupferfreie Click-Chemie angebunden. Im Anschluss erfolgte die Konjugation des sterisch anspruchsvollen Antikörpers aDEC205 bzw. aCD11c. Die erfolgreiche Konjugation wurde über UV-VIS, SDS-PAGE, FCS und CLSM gezeigt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde festgestellt, dass das Adjuvans CpG1826 nach Konjugation an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste zu einer unspezifischen Bindung (Aufnahme) an (in) DCs führt. Diese konnte durch Vorinkubation der Zellen mit Serum weitestgehend unterdrückt werden. Die zusätzliche Anbindung des Antikörpers aDEC205 an das Polymer-CpG Konjugat führte wiederum trotz Seruminkubation wie erwünscht zu einer DEC205-rezeptorvermittelten Zellanbindung (-aufnahme).

OT-I T-Zell Proliferationsversuche ergaben für die Antigen enthaltenen Konjugate, welche mittels aDEC205 gezielt an die CD8<sup>+</sup> DCs adressiert wurden, eine viel stärkere T-Zell Proliferation als die Konjugate ohne Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein Konjugat ohne Antigen (Polymer-Antikörper), welches keine T-Zell Proliferation zeigte.

Um den Einfluss verschiedener Polymertopologien auf ihre Biodistribution sowie Blutzirkulation zu untersuchen, wurde die N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste mittels GPC fraktioniert. Es wurden drei verschiedene Fraktionen erhalten: Hochmolekulare wurmartige Polymerbürsten, ellipsoidartige Polymerbürsten und niedermolekulare kugelförmige Moleküle. Die beiden erstgenannten zeigten eine breite Verteilung im Körper. Für die Kugelfraktion wurde



das stärkste Fluoreszenzsignal in der Niere bzw. Blase beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Untersuchung der Blutzirkulationszeiten. Hierbei waren die Kugeln bereits 24h nach Injektion vollständig aus dem Blutkreislauf entfernt. Im Gegensatz dazu wurden für die ellipsoidartigen sowie wurmartigen Polymere noch nach 48 h ausreichend hohe Fluoreszenzsignale detektiert.

In Folge dieser vielversprechenden Ergebnisse ist in weiteren *in vivo* Versuchen zu testen, ob nach Konjugation der drei bioaktiven Komponenten an die verschiedenen Polymerfraktionen ähnliche Ergebnisse hinsichtlich Blutzirkulationszeit sowie Biodistribution erzielt werden können. Des Weiteren werden die synthetisierten Konjugate bezüglich ihres Vermögens zur Tumorreduzierung (B16-Melanom) untersucht.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Chemikalien

Chemikalie/Material	Firma	Bestellnummer	Verwendungszweck
aDEC205(DEC205/HB290 rat $\alpha$ mouse IgG2a)	BioXCell	BE00105	Konjugation
AlexaFluor <sup>®</sup> 488-TFP Ester	Invitrogen	A30005	Fluoreszenzmarkierung
AlexaFluor <sup>®</sup> 488-DIBO Alkyne	Invitrogen	C10405	Fluoreszenzmarkierung
AlexaFluor <sup>®</sup> 647-NHS-Ester	Invitrogen	A20006	Fluoreszenzmarkierung
AlexaFluor <sup>®</sup> 647-DIBO Alkyne	Invitrogen	C10408	Fluoreszenzmarkierung
AlexaFluor <sup>®</sup> 546-NHS-Ester	Invitrogen	A20002	Fluoreszenzmarkierung
AlexaFluor <sup>®</sup> 568-NHS-Ester	Invitrogen	A20103	Fluoreszenzmarkierung
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units 3 kDa	Millipore	UFC800324	Aufreinigung
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units 10 kDa	Millipore	UFC201024	Aufreinigung
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units 30 kDa	Millipore	UFC203024	Aufreinigung
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units 100 kDa	Millipore	UFC210024	Aufreinigung
AntiCD11c (N418)			Konjugation
Anti-LAMP1 antibody	Sapphire Bioscience	ab24170	Färbung
Antigen (CSGLEQLESIIINFEKL)-DBCO	Bachem	4087180	Konjugation
Antigen (CSGLEQLESIIINFEKL)	Bachem	4062191	Konjugation
BHQ2-CpG	Integrated DNA Technologies	7897742	Quenching
BHQ2-V1	Integrated DNA Technologies	8059189	Quenching
BioGelP30	BioRad	150-4150	Aufreinigung
BioGelP100	BioRad	150-4174	Aufreinigung
Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD8a Antibody	Australian Biosearch (BioLegend)	100738	Färbung
Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD11c Antibody	Australian Biosearch (BioLegend)	117338	Färbung
CarboxyRhodamin110	JenaBioscience		Fluoreszenzmarkierung
CD8a Rat Anti-Mouse mAb (clone 5H10), Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Conjugate	Invitrogen	MCD0820	Färbung

## 7. Experimenteller Teil

<b>CellTrace Violet</b>	Invitrogen	C34557	Durchflusszytometrie
<b>CpG-FIP-SH</b>	Integrated DNA Technologies		Konjugation
<b>CpG-1826-DBCO</b>	IBA	160787	Konjugation
<b>DBCO-FIP</b>	IBA	157829	Konjugation
<b>DBCO-PEG4-NHS-Ester</b>	JenaBioscience		“Crosslinker”
<b>DBCO-PEG4-Maleimid</b>	JenaBioscience		“Crosslinker”
<b>DIBO-NHS-Ester</b>	Invitrogen	C-10414	“Crosslinker”
<b>DMSO</b>	Invitrogen	D12345	Lösungsmittel
<b>DPBS 1X</b>	Invitrogen	14190144	Puffer
<b>IgG from mouse serum (025K7580)</b>	Sigma Aldrich	5381	Proteinfraction/Kontrollantikörper
<b>IRDye® 800CW DBCO</b>	Licor	929-55000	Fluoreszenzmarkierung
<b>HFIP</b>	Sigma Aldrich	105228	Fraktionierung
<b>Hoechst33342 Trihydrochloride Trihydrate</b>	Invitrogen	H3570	Zellkernfärbung
<b>NuPage® Novex® 4-12% Tris-Bis Gel</b>	Invitrogen	NP0322	Charakterisierung
<b>NuPage® SDS MOPS running buffer</b>	Invitrogen	NP0001	Charakterisierung
<b>NuPage® LDS sample buffer</b>	Invitrogen	NP0007	Charakterisierung
<b>NuPage® Reducing agent</b>	Invitrogen	NP0004	Charakterisierung
<b>Pall 300 kDa</b>	Sigma Aldrich	Z722189-100EA	Aufreinigung
<b>PE-antimouse TCR Va2, Clone B20.1</b>	Biologend		Färbung
<b>SilverQuest™ Silver Staining Kit</b>	Invitrogen	LC6070	Charakterisierung
<b>SimplyBlue SafeStain</b>	Invitrogen	LC6060	Charakterisierung
<b>Sodiumbicarbonate</b>	Sigma Aldrich	S6014	pH-Wert Einstellung
<b>Steriles Wasser</b>	B. Braun	0082479E	Lösungsmittel
<b>Zeba 7k columns</b>	Pierce	89883	Aufreinigung
<b>Zeba 40k columns</b>	Pierce	87767	Aufreinigung

## 7.2 Dialyse

Die für die Dialyse verwendeten Membranen werden vor Gebrauch mit MilliQ-Wasser befüllt und 60 Minuten in MilliQ-Wasser equilibriert. Dadurch werden Rückstände von Glycerin an der Membran entfernt.

## 7.3 Gelelektrophorese (SDS Page)

Es werden fertige „NuPage“ Tris-Glycin Gele (4-12%) und eine „XCell Surelock“ Mini-Zelle, beides von *Invitrogen*, verwendet. Als Laufpuffer werden 40 mL 20X MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure) verdünnt auf 800 mL Wasser benutzt. Das Gesamtvolumen der Proben beträgt 10  $\mu$ L. Hierbei wird die aufgetragene Menge an Polymer/Protein zwischen den verschiedenen Proben konstant gehalten. Zu jeder Probe werden 2.5  $\mu$ L „NuPAGE LDS Sample Buffer“ (Invitrogen) und ggf. 1  $\mu$ L „NuPAGE Sample Reducing Agent“ (Invitrogen) gegeben. Nach anschließender kurzer Zentrifugation werden die Proben für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Gelelektrophorese findet bei 125 mA, 200 V und 20W für circa 90 Minuten statt. Die Gele werden im Anschluss dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und mit „Simply Blue Safe Stain“ oder mittels „SilverStain“ (Invitrogen) nach dem Standardprotokoll angefärbt.

## 7.4 TNBSA-Test zur Quantifizierung von primären Aminen

Zur Quantifizierung der freien primären Amine wird das Assay des TNBSA-Tests nach dem Standardprotokoll von *Pierce* durchgeführt. Zu Beginn wird eine Kalibrierfunktion mit Glycin (eine Aminogruppe) aufgestellt. Hierzu werden vier Glycinlösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen  $1.25 \cdot 10^{-7}$  mol/mL und  $7 \cdot 10^{-7}$  mol/mL in Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH = 8,5) angesetzt. Die Kalibrierstandards und die unbekanntenen Proben werden laut Vorschrift des Assays behandelt. Zu je 1 mL Lösung werden 0.5 mL 5%-TNBSA Lösung (frisch hergestellt, gelöst in Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH = 8,5) zugegeben und gut durchmischt (vortexen). Es wird für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen werden anschließend 0,5 mL Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0,25 mL 1N Salzsäure zugegeben und wieder gut durchmischt. Die Extinktion der Proben wird bei einer Wellenlänge  $\lambda = 335$  nm gemessen. Anhand der in Abbildung 7-1 dargestellten Kalibriergerade kann die Konzentration an primären Aminen bestimmt werden.

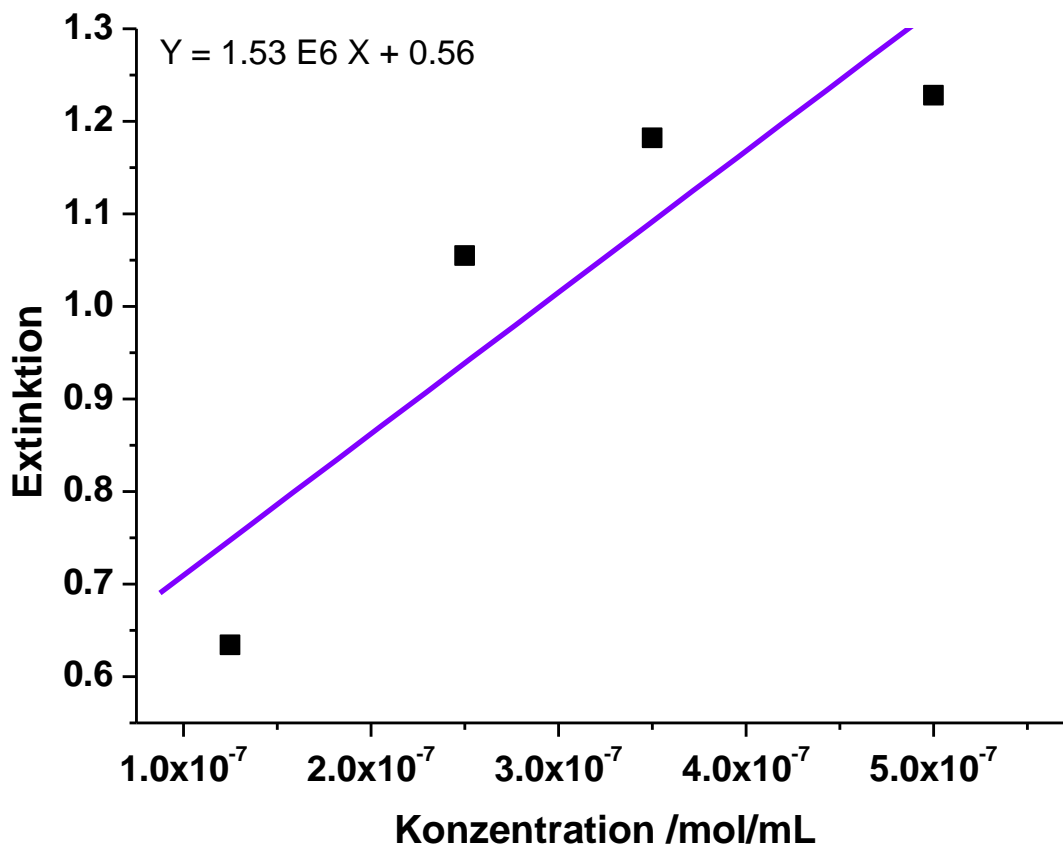


Abbildung 7-1: --- UV/Vis Kalibriergerade ( $\lambda=335 \text{ nm}$ ) und --- linearer Fit zur photometrischen Quantifizierung der freien primären Aminen (TNBSA-Test)

## 7.5 Synthesen zu Kapitel 5

### 7.5.1 Succinylierung von Poly-L-lysin (PLL) und der Poly-L-lysin-Bürste (PLL-B\_55-3-2)<sup>[150]</sup>

Zu einer Lösung von PLL/PLL-B in 2 mL 0,2 M Natriumbicarbonatpuffer wird Bernsteinsäureanhydrid als Feststoff zugegeben. Der pH-Wert wird mit Hilfe von 1 M Bicarbonatpuffer auf pH = 8,5 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, für 72 h gegen Milli-Q Wasser dialysiert (MW = 1000 kDa/10.000 kDa) und schließlich lyophilisiert. Die entsprechenden Ansätze der verschiedenen Succinylierungsgrade sind in Tabelle 7-1 angegeben.

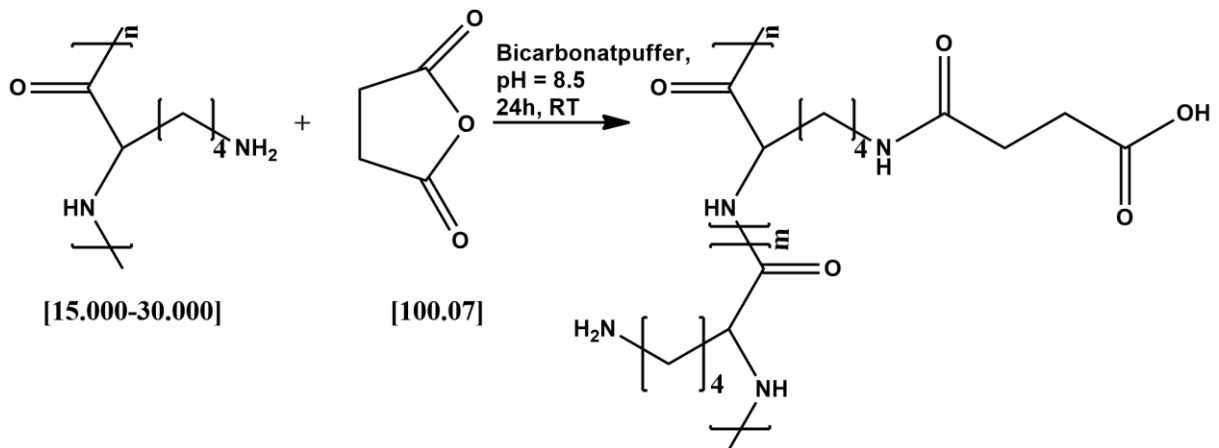
Abbildung 7-2: Succinylierung von linearem PLL mittels Bernsteinsäureanhydrid<sup>[150]</sup>

Tabelle 7-1: Ansätze zur Synthese der succinylierten linearen PLLs

Probe	Kürzel	PLL/mg	Bernsteinsäure-Anhydrid/mg	Ausbeute/mg
37%-Succ-PLL	SG32	85	16.3	44 (52%)
49%-Succ-PLL	SG31A	70	16.5	35 (50%)
60%-Succ-PLL	SG24A	80	22.8	52 (65%)
70%-Succ-PLL	SG15A	65	31	46 (70%)
100%-Succ-PLL	SG1	100	880	60 (60%)

Tabelle 7-2: Ansätze zur Synthese der succinylierten PLL-Bürsten

Probe	Kürzel	PLL-B/mg	Bernsteinsäure-Anhydrid/mg	Ausbeute/mg
37%-Succ-PLL-B	SG37	25	9	6 (24%)
50%-Succ-PLL-B	SG36	30	14	11 (37%)
20%-Succ-PLL-B	SG40	31	4.4	25 (80%)

### Charakterisierung der succinylierten Poly-L-lysine (PLLs)

Die zu unterschiedlichen Graden succinylierten PLLs werden mittels <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O), <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) und TNBSA-Test charakterisiert.

#### 37%-Succ-PLL (SG32)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.26 (t-br, 2H, H-1, H-8), 3.13 (t, 2H, J = 9, 6, 3 Hz, H-5), 2.94 (t, 2H, J = 9, 6, 3 Hz, H-12), 2.42 (m, 4H, H-6, H-7), 1.83-1.23 (m, 12H, H-2, H-3, H-4, H-9, H-10, H-11).

**49%-Succ-PLL (SG31A)**

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.24 (t-br, 2H, H-1, H-8), 3.15 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-5), 2.97 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-12), 2.43 (m, 4H, H-6,H-7), 1.91-1.23 (m, 12H, H-2,H-3,H-4,H-9,H-10,H-11).**

**60%-Succ-PLL (SG24A)**

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.2 (t-br, 2H, H-1, H-8), 3.13 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-5), 2.95 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-12), 2.45 (m, 4H, H-6,H-7), 1.90-1.25 (m, 12H, H-2,H-3,H-4,H-9,H-10,H-11).**

**70%-Succ-PLL (SG15A)**

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.08 (t-br, 2H, H-1, H-8), 3.13 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-5), 2.95 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-12), 2.45 (m, 4H, H-6,H-7), 1.82-1.23 (m, 12H, H-2,H-3,H-4,H-9,H-10,H-11).**

**100%-Succ-PLL (SG1)**

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 4.26 (t-br, 1H, H-1), 3.13 (t, 2H, *J* = 9, 6, 3 Hz, H-5), 2.43 (m, 4H, H-6,H-7), 1.86-1.23 (m, 6H, H-2,H-3,H-4).**

**<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 180.49 (C-10), 175.21 (C-1), 173.42 (C-7), 60.94 (C-2), 53.28 (C-2), 38.92 (C-6), 33.68 (C-3), 32.57 (C-5), 32.03 (C-4), 30.50 (C-9), 27.64 (C-8), 22.24.**

**Charakterisierung der succinylierten Poly-L-lysine-Bürsten (PLL-B)**

Die succinylierten PLL-Bürsten werden mittels DLS und Elementaranalyse<sup>4</sup> analysiert.

Probe	Kürzel	C: Masse-%	N: Masse-%	Succinylierungsgrad	R <sub>h</sub> /nm
<b>37%-Succ-PLL-B</b>	SG37	50.90	15.8	0.37	62
<b>50%-Succ-PLL-B</b>	SG36	50.02	14.5	0.49	59.9
<b>20%-Succ-PLL-B</b>	SG40	51.57	17.6	0.20	56

<sup>4</sup> Mikroanalytisches Labor XXXXXXXXXX

### 7.5.2 Farbstoffmarkierung des Antikörpers aDEC205

Eine Lösung von 1 mL aDEC205 (7,3 g/L) in MilliQ-H<sub>2</sub>O (pH = 7) wird mittels 100 µL 1 M NaHCO<sub>3</sub> auf einen pH = 8 eingestellt. Diese Lösung wird zu 1 mg (0,77 µmol) AlexaFluor647-NHS Ester gegeben und für 24 h bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wird über BioRad Biogel-P30 mit 1XPBS (pH =7,2) als Laufmittel aufgereinigt.

Die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Antikörper werden mittels UV-VIS nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{mol Farbstoff pro mol Protein} = \frac{A_{650} * 203000}{239\ 000 * [A_{280} - (A_{650} * 0.03)]}$$

mit  $\epsilon = 203.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  Extinktionskoeffizient des IgG Antikörpers bei einer Wellenlänge von 280 nm,  $\epsilon = 239.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  Extinktionskoeffizient von AlexaFluor 647 bei 650 nm und dem Korrekturfaktor 0,03, welcher den Beitrag des Farbstoffs zur Absorption bei 280 nm angibt.

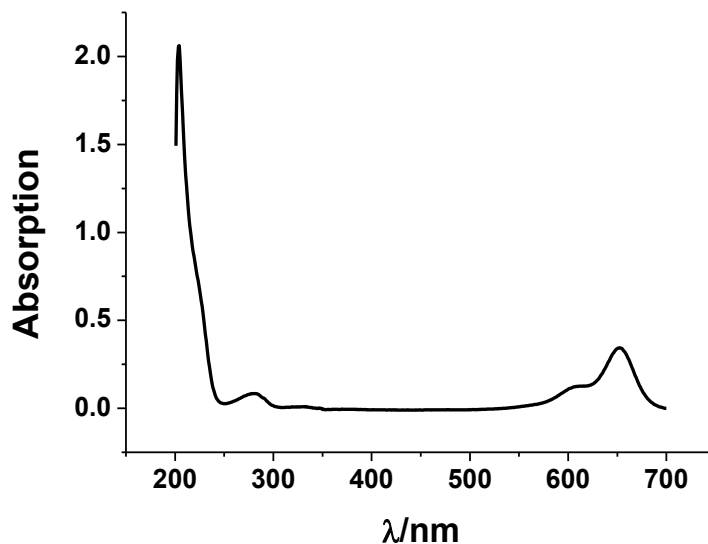


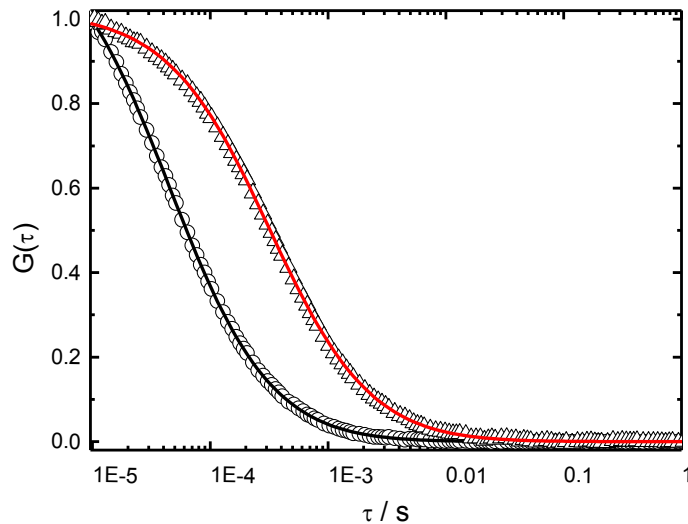
Abbildung 7-3: UV-VIS Spektrum von aDEC205-AF647 nach Verdünnung (VF = 50)

Tabelle 7-3: Kalkulation des Markierungsgrades

Probe	VF	A650	A280	Proteinkonzentration	# Farbstoffe pro Antikörper
aDEC205-AF647	50	0.335	0.08	$1.73 \cdot 10^{-05} \text{ M}$	3.9



Für DEC205-AF647 werden circa 3-4 Farbstoffmoleküle pro Antikörper erhalten. Dieses Ergebnis wird mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie bestätigt.



**Abbildung 7-4: Normalisierte FCS Autokorrelationskurven und deren entsprechenden Fits (Linie) für AlexaFluor647 (○) und Farbstoffmarkierter Antikörper aDEC205 (◄), Rh (Antikörper) = 5 nm; 3-4 Antikörper pro Polymer**

### 7.5.3 Farbstoffmarkierung der Polymere

Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere werden mittels des Farbstoffs AlexaFluor488 (Invitrogen) bzw. Carboxyrhodamin110 (Jenabioscience) oder AlexaFluor647 (Invitrogen) markiert. Für die *in vivo* Experimente werden die verschiedenen Polymerfraktionen mittels des IR-Farbstoffs CW800 (Liquor) markiert.

#### 7.5.3.1 Farbstoffmarkierung der verschiedenen Poly-L-lysine mittels AlexaFluor488

Die Farbstoffmarkierung der verschiedenen Poly-L-lysine erfolgt über einen reaktiven TFP-Ester. Hierzu werden die Polymere in 0.1 M Bicarbonatpuffer (pH = 8,3) gelöst, zum reaktiven Farbstoff gegeben und unter Lichtausschluss für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Biorad Biogel-P30 mit 1X PBS (pH = 7,2) als Laufmittel. Die Anzahl der gebundenen Farbstoffe pro Polymer wird in Kooperation mit [REDACTED] (MPI) mittels FCS bestimmt. Fluoreszenzspektroskopie-Messungen zeigen einen Quantenausbeuteverlust zwischen einem Faktor von 2-4, der korrigiert wurde um den Grad der Markierung anzugeben.

Tabelle 7-4: Ansatz zur Farbstoffmarkierung der verschiedenen PLLs

Probe	Polymer/ mg	Polymer/ mol	Farbstoff /mg	Farbstoff/ mol	Farbstoffmar- kierungsgrad
PLL	4	$5.33 \cdot 10^{-07}$	1.90	$2.14 \cdot 10^{-06}$	1
Succ-PLL <sup>5</sup>	1	$1.33 \cdot 10^{-07}$	0.475	$5.36 \cdot 10^{-07}$	2
50%-Succ-PLL-B	5	$1.1 \cdot 10^{-09}$	0.25	$2.82 \cdot 10^{-07}$	60
37%-Succ-PLL-B	3	$6.6 \cdot 10^{-10}$	0.125	$1.41 \cdot 10^{-07}$	80
20%-Succ-PLL-B	8.3	$2.0 \cdot 10^{-09}$	0.28	$3.16 \cdot 10^{-07}$	30

### 7.5.3.2 Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten mittels Carboxyrhodamin110

Die Poly(2-oxazolin)bürsten wurden von [REDACTED] über kupferfreie Click-Chemie mit dem Farbstoff Carboxyrhodamin110 markiert.<sup>[114]</sup>

Tabelle 7-5: Ansatz zur Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten

Probe	Farbstoff/ $\mu\text{mol}$	Azidgruppen/ $\mu\text{mol}$	Zugabe H <sub>2</sub> O	Farbstoff- markierungsgrad
N <sub>3</sub> -PiPrOx (JB111)	0.17	8.3	2.1	3
N <sub>3</sub> -PEtOx (JB116)	0.22	16	4.1	4
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx (JB99)	0.55	14	3	4.6

### 7.5.3.3 Farbstoffmarkierung der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-iPrOx-Bürste mittels AlexaFluor488

20 mg ( $1,56 \cdot 10^{-8}$  mol) der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste werden über Nacht in 1 mL PBS (1X) gelöst. Zu dieser Lösung werden 16,2  $\mu\text{L}$  ( $8,1 \cdot 10^{-8}$  mol) AlexaFluor488-DBCO (5mM gelöst in DMSO) zugegeben und für 3 Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Der freie Farbstoff wird mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices“ 10.000 kDa bei 3800 rpm, 15 °C und 15 min abgetrennt. Durch FCS-Messungen wird die Anzahl der gebundenen Farbstoffe auf 5 bestimmt. Die Fluoreszenzspektroskopie-Messungen zeigen einen Quantenausbeuteverlust von 20% des konjugierten Farbstoffs im Vergleich zum freien Farbstoff.

<sup>5</sup> Die Farbstoffmarkierung des succinylierten linearen PLLs wurde von [REDACTED] durchgeführt

#### 7.5.3.4 Farbstoffmarkierung der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste mittels AlexaFluor647

6 mg (4,7 E-09 mol) der N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste werden über Nacht in 300 µL PBS (1X) gelöst. Zu dieser Lösung werden 8 µL (2,6 E-08 mol) AlexaFluor647-DBCO (5 g/L gelöst in DMSO) zugegeben und für 5 Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Der freie Farbstoff wird mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices“ 30.000 kDa bei 3.800 rpm, 15 °C und 15 min abgetrennt.

#### 7.5.3.5 Farbstoffmarkierung der fraktionierten N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste mittels CW800

Die N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürsten werden über Nacht in MilliQ-Wasser (Braun) gelöst, zum reaktiven Farbstoff gegeben und unter Lichtausschluss für 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der nichtreagierte Farbstoff wird mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices“ 10.000 kDa bei 3.800 rpm, 15 °C und 15 min abgetrennt. Zur Bestimmung des Farbstoffmarkierungsgrad wird jeweils ein Aliquot des CW800-markierten Polymers zusätzlich mit einem weiteren Farbstoff, welcher mittels FCS detektierbar ist (AF488 oder AF568), markiert. Nach Abtrennung des Farbstoffs wird mittels FCS die Anzahl der Farbstoffe (AF488 bzw. AF568) ermittelt. Im Anschluss wird mit Hilfe der UV-VIS Spektroskopie über das Verhältnis des Farbstoff CW800 zum Farbstoff AF488 bzw AF568 der Farbstoffmarkierungsgrad bestimmt.

**Tabelle 7-6: Ansatz zur Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten-Fraktionen**

Probe	Polymer / mg	Polymer / mol	Farbstoff / µg	Farbstoff / mol	Farbstoffmarkierungsgrad
N <sub>3</sub> -PEtOx-Kugelfraktion	5.7	2.28*10 <sup>-08</sup>	90	6.84*10 <sup>-08</sup>	4
N <sub>3</sub> -PEtOx-Ellipsoidfraktion	10	1.70*10 <sup>-08</sup>	68	5.10*10 <sup>-08</sup>	3
N <sub>3</sub> -PEtOx-Wurmfraktion	8	5.00*10 <sup>-09</sup>	20	1.50*10 <sup>-08</sup>	2

#### **7.5.4 Farbstoffmarkierung des Antigens**

Zu einer Lösung von 5,85 mg ( $2,6 \text{ E-}06 \text{ mol}$ ) Antigen-DBCO in 500  $\mu\text{L}$  DMSO werden 2,5 mg ( $3,15 \text{ E-}06 \text{ mol}$ ) AlexaFluor568 NHS-Ester, gelöst in 300  $\mu\text{L}$  DMSO, zugegeben und über Nacht unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Da sich die Molekulargewichte des Antigens [ $2250 \text{ g/mol}$ ] und des Farbstoffs AlexaFluor568-NHS [ $791 \text{ g/mol}$ ] kaum unterscheiden kann der freie Farbstoff nicht abgetrennt werden. Es wird eine Markierungseffizienz von 1 angenommen.

#### **7.5.5 Funktionalisierung von aDEC205**

##### **7.5.5.1 Funktionalisierung von aDEC205 mit DIBO-NHS**

In einem typischen Experiment werden zu einer Lösung von aDEC205-AF647 (0,10 mg,  $6,5 \text{ E-}10 \text{ mol}$ ) in 1X DPBS (50  $\mu\text{L}$ ) 8  $\mu\text{L}$  ( $1,63 \text{ E-}08 \text{ mol}$ ) des Linkers DIBO-succinimidylester (DIBO-NHS), gelöst in DMSO (1 g/L) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 3h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand des Linkers wird mit Hilfe von „Zeba Spin Desalting columns“ 40 kDa (PIERCE) bei 1.500 x g, 4 °C und 2 min entfernt (2X).

##### **7.5.5.2 Aggregatfreie Funktionalisierung von aDEC205 mit DBCO-PEG4-NHS**

Zu einer Lösung von 300  $\mu\text{L}$  anotop 20 nm filtriertem aDEC205 ( $4,1 \text{ E-}09 \text{ mol}$ ) in 1X DPBS werden 27  $\mu\text{L}$  ( $4,1 \text{ E-}08 \text{ mol}$ ) des Linkers DBCO-PEG4-succinimidylester (DBCO-PEG4-NHS), gelöst in DMSO (10 g/L) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die sich gebildeten Aggregate werden mit Hilfe von „PALL Nanosep Devices“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überschuss an nichtreagiertem Linker wird im Anschluss mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices“ 10.000 kDa bei 3.800 rpm, 15 °C und 10 min abgetrennt.

### 7.5.5.3 Bestimmung der Effizienz der DBCO-Funktionalisierung

Die Anzahl der DBCO-Moleküle pro Antikörper werden mittels UV-VIS nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Anzahl DBCO pro IgG} = \frac{\text{Molarität von DBCO}}{\text{Molarität von IgG}}$$

Mit der Molarität von DBCO:

$$\text{Molarität von DBCO} = \frac{A_{309}(\text{DBCO})}{\epsilon_{309}(\text{DBCO})}$$

Und der Molarität von IgG:

$$\text{Molarität von IgG} = \frac{A_{309}(\text{IgG})}{\epsilon_{309}(\text{IgG})}$$

mit  $\epsilon_{309}(\text{DBCO}) = 12.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Lcm}^{-1}$  Extinktionskoeffizient von DBCO bei einer Wellenlänge von 309 nm und  $A_{309} \text{ DBCO}$  die Absorption vom Konjugat bei 309 nm.

### 7.5.6 Konjugation von aDEC205 an PLL, 37%-Succ-PLL und 37%-Succ-PLL-B

#### 7.5.6.1 Funktionalisierung von PLL, 37%-Succ-PLL und 37%-Succ-PLL-B mit NHS-PEG<sub>12</sub>-N<sub>3</sub>

Zu einer Lösung von Polymer-AF488 gelöst in 1X DPBS wird der Linker N<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-succinimidylester (N<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-NHS), gelöst in DMSO (20 mM), zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand des Linkers wird mit Hilfe von Biorad Biogel-P30 abgetrennt. Um das Gelingen der Reaktion zu prüfen, wird nach Azid-Funktionalisierung die Probe mit dem Farbstoff DBCO-Sulfo-PEG<sub>4</sub>-Rhodamin umgesetzt. Das Gemisch wird für 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der nicht reagierte freie Farbstoff wird mittels Biorad Biogel-P30 abgetrennt.

**Tabelle 7-7: Ansatz zur Azid-Funktionalisierung der verschiedenen PLLs**

Probe	Polymer/ µg	Polymer/ mol	Linker/ mg	Linker/ mol	Farbstoffmarkierungsgrad
PLL	76	1.00*10 <sup>-08</sup>	5.4	7.34*10 <sup>-06</sup>	2
PLL	4.8	6.5*10 <sup>-10</sup>	0.433	5.85*10 <sup>-07</sup>	n.b.
37%-Succ-PLL	5.3	6.5*10 <sup>-10</sup>	0.475	3.57*10 <sup>-07</sup>	n.b.
37%-Succ-PLL-B	58.5	1.3*10 <sup>-11</sup>	4.8	6.50*10 <sup>-06</sup>	n.b.
50%-Succ-PLL-B	58.5	1.3*10 <sup>-11</sup>	4.8	6.50*10 <sup>-06</sup>	n.b.

### 7.5.7 Konjugation von aDEC205 an Azid-funktionalisierte Polymere

DIBO-funktionalisiertes aDEC205-AF647 (siehe 7.5.5) gelöst in 1X DPBS wird je nach Experiment in einem 5-15 X molaren Überschuss zum Azid-funktionalisierten Polymer gegeben und für 3 Tage unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 40 kDa bei 1.500 x g und 4 °C für 2 min und anschließend je nach Polymer mit „Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices“ 100.000 kDa bei 3.800 rpm und 15 °C oder „PALL Nanosep Devices“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C aufgereinigt.

Tabelle 7-8: Ansatz zur Konjugation von aDEC205 an N<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Poly-L-Lysine

Probe	Polymer/ µg	Polymer/ mol	aDEC205/ mg	aDEC205/ mol	Poly/ aDEC205
N <sub>3</sub> -PEG <sub>12</sub> -PLL-AF488	4.8	6.5*10 <sup>-10</sup>	0.10	6.5*10 <sup>-10</sup>	1/1
N <sub>3</sub> -PEG <sub>12</sub> -37%-Succ- PLL-AF488	5.3	6.5*10 <sup>-10</sup>	0.10	6.5*10 <sup>-10</sup>	1/1
N <sub>3</sub> -PEG <sub>12</sub> -37%-Succ- PLL-B-AF488	58.5	1.3*10 <sup>-11</sup>	0.049	3.25*10 <sup>-10</sup>	1/10
N <sub>3</sub> -PEG <sub>12</sub> -50%-Succ- PLL-B-AF488	58.5	1.3*10 <sup>-11</sup>	0.049	3.25*10 <sup>-10</sup>	1/7

Tabelle 7-9: Ansatz zur Konjugation von aDEC205 an N<sub>3</sub>-Poly(2-oxazolin)bürsten

Probe	Polymer/ µg	Polymer/ mol	aDEC205/ mg	aDEC205/ mol	Poly/aDEC
N <sub>3</sub> -PEtOx-CRh110-I	48	1.3*10 <sup>-10</sup>	0.10	6.5*10 <sup>-10</sup>	1/3
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx CRh110 –II	73	5.7*10 <sup>-11</sup>	0.13	8.3*10 <sup>-10</sup>	1/3
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx CRh110-III	55	4.3*10 <sup>-11</sup>	0.10	6.5*10 <sup>-10</sup>	1/10
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF488-IV	73	5.7*10 <sup>-11</sup>	0.075	5.0*10 <sup>-10</sup>	1/5
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF488-V	59	4.6*10 <sup>-11</sup>	0.10	6.5*10 <sup>-10</sup>	1/10

### 7.5.8 Konjugation von Antigen-AF546 (SIINFEKL) und anschließende Konjugation von aDEC205 an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

10 µL N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Bürste (324 µg, 1,8 E-10 mol) in 1X DPBS werden mit 0,81 µL (8,1E-10 mol) DBCO-PEG4-Maleimid-Linker, gelöst in DMSO (10 mM), für 16 h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand an Linker wird mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 7 kDa und 40 kDa bei 1.500 x g und 4 °C für 2min entfernt. Gleichzeitig wird das Antigen-AF546 mit Hilfe von „TCEP Reducing Gel“ nach dem Standardprotokoll von *PIERCE* reduziert. Im Anschluss werden 8,0 E-09 mol des AF546-Antigens mit 275 µg (1.6 E-10 mol) maleimidfunktionalisierter N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488 Polymerbürste zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsmischung wird für 16 h unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 40 kDa bei 1.500 x g und 4 °C für 2 min und anschließend mit Hilfe von „PALL Nanosep centrifugal device“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C für 8 min bis das Filtrat farblos ist. Die anschließende Konjugation des jeweiligen Antikörpers erfolgt wie in 7.5.7 beschrieben.

### 7.5.9 Konjugation von CpG1826-DBCO (IBA Germany) an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

10 µL N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-CRh110 (192 µg, 1,5 E-10 mol) werden mit der jeweiligen Menge DBCO-CpG, gelöst in MilliQ-Wasser (0,1 nM), für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels „PALL Nanosep centrifugal device“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C für 8 min.

**Tabelle 7-10: Ansatz zur Konjugation von aDEC205 an N<sub>3</sub>-Poly(2-oxazolin)bürsten**

Probe	Polymer/ µg	Polymer/ mol	CpG/ µg	CpG/ mol	Poly/CpG
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CRh110	192	1.5*10 <sup>-10</sup>	0.95	1.5*10 <sup>-10</sup>	1/1
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CRh110	192	1.5*10 <sup>-10</sup>	4.77	7.5*10 <sup>-10</sup>	1/5
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CRh110	192	1.5*10 <sup>-10</sup>	9.54	1.5*10 <sup>-09</sup>	1/10

### 7.5.10 Konjugation von CpG1826-DBCO (IBA Germany), Antigen(SIINFEKL)-DBCO und aDEC205/aCD11c an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

30 µL N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-AF647 (805 µg, 6,3 E-10 mol) werden mit 2,5 µL (1,0 E-08 mol) DBCO-Antigen-AF568 für 2 Tage bei 20 °C inkubiert. Nach einem Tag werden 38 µL DBCO-CpG (3,78 E-09 mol), gelöst in MilliQ-Wasser (0,1 nM) zu einem Aliquot, 16,25 µL (3,15E-10 mol) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-AF647-Antigen-AF568 gegeben und für 1-2 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung des überschüssigen Antigens sowie CpGs erfolgt mit Hilfe von „PALL Nanosep centrifugal device“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C für 8 min. Die anschließende Konjugation des jeweiligen Antikörpers erfolgt wie in 7.5.7 beschrieben.

**Tabelle 7-11: Ansatz zur Konjugation von Antigen, CpG und Antikörper an N<sub>3</sub>-Poly(2-oxazolin)bürsten**

Probe	Polymer/ mol	Antigen/ mol	CpG/mol	Antikörp./ mol	Poly/AG/CpG /Antikörper
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG	6.3*10 <sup>-10</sup>	1.0*10 <sup>-08</sup>	-	-	1/17/-/-
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG-aDEC205	5.72*10 <sup>-11</sup>	1.0*10 <sup>-09</sup>	-	4.6*10 <sup>-10</sup>	1/17/-/8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG-aCD11c	1.43*10 <sup>-11</sup>	2.5*10 <sup>-10</sup>	-	8.6*10 <sup>-11</sup>	1/17/-/8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG-CpG	3.15*10 <sup>-10</sup>	5.0*10 <sup>-09</sup>	3.78*10 <sup>-09</sup>	-	1/17/12/-
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-CpG-aDEC205	1.26*10 <sup>-10</sup>	-	1.51*10 <sup>-09</sup>	1.00*10 <sup>-09</sup>	1/-/12/8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG-CpG- aDEC205	5.50*10 <sup>-11</sup>	9.35*10 <sup>-10</sup>	6.6*10 <sup>-10</sup>	4.4*10 <sup>-09</sup>	1/17/12/8
N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx AF647-AG-CpG- aCD11c	2.47E-11	4.4 E-10	3.0E-10	2.0E-10	1/17/12/8



### 7.5.11 Polymer-SHIP Konjugate

#### 7.5.11.1 Konjugation von FIP-Cy5 an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

25 µL N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste-AF488 (576 µg, 4,5 E-10 mol) werden mit 42 µL DBCO-FIP-Cy5 (6,3 E-09 mol), gelöst in MilliQ-Wasser (150 µM), für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 40 kDa bei 1.500 x g und 4 °C für 2 min und anschließend mit Hilfe von „PALL Nanosep centrifugal devices“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C für 8 min bis das Filtrat farblos ist.

Die anschließende Konjugation von aDEC205 bzw. aCD11c erfolgt nach vorheriger DIBO-Modifizierung wie in Abschnitt 7.5.7 beschrieben.

**Tabelle 7-12: Ansatz zur Konjugation von FIP und Antikörper an die N<sub>3</sub>-Poly(2-oxazolin)Bürsten**

Probe	Polymer/ mol	FIP/ mol	Antikörper/ mol	Poly/FIP/Antikörper
N <sub>3</sub> -PEtOx- b-PiPrOx AF488-FIP-Cy5	4.5*10 <sup>-10</sup>	6.3*10 <sup>-09</sup>	-	1/10/-
N <sub>3</sub> -PEtOx- b-PiPrOx AF488-FIP-Cy5- aDEC205	7.98*10 <sup>-11</sup>	7.65*10 <sup>-10</sup>	6.40*10 <sup>-10</sup>	1/10/8
N <sub>3</sub> -PEtOx- b-PiPrOx AF488-FIP-Cy5- aCD11c	5.15*10 <sup>-11</sup>	4.98*10 <sup>-10</sup>	4.12*10 <sup>-10</sup>	1/10/8

#### 7.5.11.2 Konjugation von CpG-FIP-Cy5 an die N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

Eine Lösung von N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Bürste (576 µg, 4,5 E-10 mol) in 1X DPBS (30 µL) wird mit 1,5 µL (3,0 E-08 mol) DBCO-PEG4-Maleimid-Linker, gelöst in DMSO (20 mM), für 16 h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand an Linker wird mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 7 kDa und 40 kDa bei 1.500 x g und 4 °C für 2min entfernt. Gleichzeitig wird das CpG-FIP-Cy5 mit Hilfe von „TCEP-Reducing gel“ nach dem Standardprotokoll von *PIERCE* reduziert. Im Anschluss werden 4,02 E-09 mol CpG-FIP-Cy5 mit 428 µg (3.35 E-10 mol) maleimidfunktionalisierter N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488 Polymerbürste zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsmischung wird für 3 Tage unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels „Zeba Spin Desalting columns“ 40 kDa bei 1500 x g und 4 °C für 2 min und anschließend mit Hilfe von „PALL Nanosep centrifugal device“ 300 kDa bei 14.000 x g und 4 °C für 8 min bis das Filtrat farblos ist.

Die anschließende Konjugation von aDEC205 bzw. aCD11c erfolgt nach vorheriger DIBO-Modifizierung wie in Abschnitt 7.5.7 beschrieben.

**Tabelle 7-13: Ansatz zur Konjugation von CpGFIP und Antikörper an die N<sub>3</sub>-Poly(2-oxazolin)Bürsten**

Probe	Polymer/ mol	CpGFIP/ mol	Antikörper/ mol	Poly/CpGFIP/Antikörper
<b>N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx AF488-CpGFIP-Cy5</b>	3.35*10 <sup>-10</sup>	4.02*10 <sup>-09</sup>	-	1/13/-
<b>N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx AF488-CpGFIP-Cy5- aDEC205</b>	1.10*10 <sup>-10</sup>	1.45*10 <sup>-09</sup>	8.80*10 <sup>-10</sup>	1/13/8
<b>N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx AF488-CpGFIP-Cy5- aCD11c</b>	6.60*10 <sup>-11</sup>	8.68*10 <sup>-10</sup>	5.28*10 <sup>-10</sup>	1/13/8

## 7.6 Protokoll zur Isolation von dendritischen Zellen

Isolation von murinen dendritischen Zellen aus der Milz

Dieses Protokoll ist für 8 Organe optimiert.

Vorgehensweise:

- Es werden 10 mL 1,077 Nycodenz/8 Milzen auf Eis aufgetaut.
  - Es wird 1 mL DNA/Kollagenase/ 8 Milzen auf Eis aufgetaut.
  - Es wird ein Aliquot von 10 mL fetalem Kälberserum (FCS) bei Raumtemperatur aufgetaut.
  - Es wird eine 10% EDTA FCS Lösung hergestellt.
  - Antikörpercocktail für konventionelle DCs (roter Punkt):
    - CD3-ε (KT3-1.1)
    - CD45R (RA36B2)
    - CD90 (T24/31.7)
    - Ly6G & Ly6C (RB68C5)
    - Erythroid (TER119)
1. Die Milzen und das Medium werden in eine Petrischale gegossen. Von jeder Milz werden die Bauspeicheldrüse, das Fett und das Bindegewebe entfernt.
  2. Die Milzen werden zu einer Paste zerschnitten.
  3. Die Paste wird in ein neues Gefäß überführt und mit 6 mL RPMI 2% FCS aufgefüllt.
  4. Es wird 1 mL DNase/ Kollagenase (Volumen: 7 mL) zugegeben.
  5. Mit Hilfe einer Transferpipette wird das Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur resuspendiert.
  6. Es werden 600 µL 0,1M EDTA bei Raumtemperatur hinzugegeben und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur resuspendiert.
  7. Die Suspension wird durch ein Metallsieb gegeben. Das Sieb wird mit RPMI 2% FCS gewaschen.
  8. Die Suspension wird in ein 50 mL Falcon überführt und mittels RPMI 2% FCS auf circa 30 mL aufgefüllt.
  9. Im Falcon wird die Suspension mit Hilfe von FCS/ 10% 0,1M EDTA unterschichtet.

10. Es wird für 7 Minuten, 1.700 RPMI bei 4 °C zentrifugiert.  
Als nächstes wird versucht DCs mit Hilfe eines Dichtegradienten in der Probe anzureichern.
11. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und das Pellet wird in 5mL Nycodenz resuspendiert.
12. In ein 14 mL Dichtegradientrohr werden 5mL Nycodenz gegeben.
13. Mit einer Glaspipette wird die Nycodenz-Zellsuspension in kreisenden Bewegungen entlang der Gefäßwand hinzugegeben. Als nächstes wird mittels der gleichen Technik mit FCS/ 10% 0,1M EDTA überschichtet.
14. Es wird für 10 Minuten bei 3.100 RPMI, 4 °C zentrifugiert. Circa 20% der Zellen sind nun DCs.
15. Es werden 30 mL EDTA/BSS + 2% FCS in einen 50 mL Falcon gegeben. Zu diesen wird die Zwischenphase des Dichtegradienten gegeben. Die Zahl der Zellen wird mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt. Zur Bestimmung der Zellzahl gilt:
  - $(\text{Zellzahl (30 – 300)} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}) \times \text{Probenvolumen (mL)}$
16. Die Zellen werden für 7 Minuten, bei 1700 RPMI, 4 °C zentrifugiert.
17. Das Zellpellet wird in 10 µL Antikörpercocktail/ $10^6$  Zellen resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.
18. Um den Überschuss an Antikörper zu entfernen werden die mit dem Antikörper markierten Zellen mit 20 mL EDTA/BSS + 2% FCS gewaschen.
19. Die Zellen werden für 7 Minuten bei 1700 RPMI, 4 °C zentrifugiert.
20. Das Pellet wird in 500 µL EDTA/BSS + 2% FCS resuspendiert.
21. Für die negative Anreicherung werden 1 mL magnetische anti-rat IgG „beads“ pro 500 µL Antikörpercocktail benötigt. Als erstes werden die „beads“ in EDTA/BSS + 2% FCS gewaschen. Hierzu werden die „beads“ und das Medium für 30 Sekunden auf einen Magnet gegeben. Das Medium wird mit einer Transferpipette entfernt. Im Anschluss wird das Gefäß vom Magneten entfernt und die Beads in EDTA/BSS + 2% FCS resuspendiert. Dies wird dreimal wiederholt.
22. 500 µL Zellen werden in das Gefäß mit den gewaschenen magnetischen „beads“ überführt.
23. Das Gefäß wird für 20 Minuten bei 4°C rotieren gelassen.

24. Im Anschluss wird das Gefäß auf den Magneten gegeben und mit EDTA/BSS = 2% FCS aufgefüllt. Nach 2 Minuten wird die nicht magnetische Fraktion mit Hilfe einer Glaspipette in ein neues Gefäß überführt.

25. Zum Abschluss wird die Zellzahl mittels der Zählkammer ermittelt.

## 7.7 SHIP-Internalisierungsprotokoll

1. Zu Beginn werden die isolierten murinen DCs in EDTA-BSS (BSS, 5 mM EDTA, 2% FCS) auf Eis und bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL resuspendiert.
2. Die Zellen (200.000 pro Zeitpunkt) und die FIP-markierte Probe ( $1 \times 10^{12}$  Partikel/500.000 Zellen) werden in ein 10 mL Falcon pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert.
3. Im Anschluss werden die Zellen pelletiert (670 g, 7 min) und der Überschuss an FIP-markierter Probe mit 10 mL EDTA-BSS und anschließend mit 5 mL DC-Medium abgewaschen.
4. Die Zellen werden bei einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/mL in DC-Medium resuspendiert.
5. Für den ersten Zeitpunkt wird ein Aliquot von 200  $\mu$ L entnommen und auf Eis gelagert.
6. Die restlichen Zellen werden bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.
7. Für jeden weiteren Zeitpunkt werden jeweils 200  $\mu$ L entnommen und auf Eis gelagert.
8. Nach dem letzten Zeitpunkt werden die Zellen pelletiert und mit 1x 200  $\mu$ L EDTA-BSS gewaschen.
9. Für die Phänotypisierung werden 50  $\mu$ L eines Färbungsgemisch bestehend aus: CD8a (1:300 in BSS/EDTA), BV421 Antimäus CD8a Klon 53-6.7; CD11 (1:400 in BSS/EDTA), N418, BV510 Antimäus CD11c Kon 418 zu allen Proben gegeben und für 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert.
10. Im Anschluss werden die Zellen pelletiert und zweimal mit jeweils 200  $\mu$ L EDTA-BSS gewaschen.
11. Vor dem letzten Pelletieren wird die 200  $\mu$ L Zellsuspension in 2x 100  $\mu$ L aufgeteilt.
12. Die Zellen werden in 100  $\mu$ L PI (1:200) (ungequenchte Proben) und in 100  $\mu$ L PI (1:200 + Quencher,  $1 \cdot 10^{-6}$  M (1:600)) (gequenchte Proben) resuspendiert.

[FIPCy5 (5' Cy5-TCAGTTCAGGACCCTCGGCT-DBCO3');

QPC (5' AGCCGAGGGTCCTGAACTGA-BHQ2 3') ;

CpGFIPCy5 (5' Cy5- GTCCATGACGTTCTGACGTT-SH 3')

CpG QPC (5' AACGTCAGGAACGTCATGGAC-BHQ2 3')) ;

13. Die Zellen werden bis zur FACS Analyse auf Eis und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

## 7.8 T-Zell Proliferationsversuch

DC Präparation:

1. Als erstes werden dendritische Zellen nach dem Protokoll aus Abschnitt 7.6 isoliert.
2. Diese werden über Nacht bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> ausgereift.
3. Am nächsten Tag werden die Zellen abzentrifugiert, mit 10 mL EDTA/BSS gewaschen und anschließend in DC-Medium (250.000 Zellen/ 1 mL) resuspendiert.
4. Die Konjugate werden in DC-Medium gelöst und auf eine 96 „well“ Platte gegeben und entlang dieser auf die entsprechenden Konzentrationen ( $c(\text{Antigen}) = 1.0\text{E}-07 \text{ M} - 1\text{E}-12 \text{ M}$ ) verdünnt. Hierbei beträgt das Endvolumen pro „well“ 100 µL.
5. Im Anschluss werden jeweils 100 µL mit  $2.5 \times 10^4$  Zellen zu den 100 µL Konjugat pro „well“ hinzu pipettiert.
6. Die Platte wird für 45 min in den Inkubator (37 °C, 10% CO<sub>2</sub>) gestellt. Hierbei werden die DCs mit Antigen (Polymer-Antigen-Konjugate) pulsiert.
7. Anschließend wird dreimal bei 1700 RPM, bei 4 °C für 2 min gewaschen. Nach Zentrifugation wird jeweils der Überstand (180 µL) vorsichtig abgenommen.
8. Die Zellen werden auf Eis aufbewahrt.

### CD8+ T Zell Isolation:

1. Es werden die Lymphknoten einer beliebigen Maus geerntet.
2. Die Lymphknoten werden durch ein 40 µm Sieb mit Hilfe von RPMI + 2% FCS gegeben.
3. Die Zellen werden bei 1700 RPM für 7 min bei 4°C zentrifugiert und im Anschluss in 0.5 mL eines CD8 Antikörper Cocktails (M1/70, F4/80, Ter119, RB6-

8C5, M5/114, GK1.5) resuspendiert. Diese Suspension wird für 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Dies erlaubt die negative Selektion der Zellen.

4. Die Reaktion wird mit 10 mL RPMI 2% FCS gequenchet und die Zellen werden bei 1700 RPMI, 4 °C für 7 min zentrifugiert.

5. Die mit Antikörper markierten Zellen werden in 500 µL RPMI 2% FCS resuspendiert und zu magnetischen Anti-IgG Beads gegeben (1 mL Beads / 0.5 mL Antikörper).

a. Um die Azide der originalen Beadlösung zu entfernen werden die BioMag IgG „beads“ in 5 mL großen Polystyrolgefäßen dreimal mit RPMI 2% FCS gewaschen.

6. Die Gefäße werden für 20 Minuten bei 4°C rotiert.

7. Anschließend wird das Gefäß mit RPMI 2% FCS aufgefüllt und auf den Magneten gestellt.

8. Es wird gewartet bis sich die magnetischen „beads“ am Rand angereichert haben und schließlich der Überstand, welcher die CD8+ T-Zellen enthält, abgenommen werden kann. Für die Färbung von CD8a (488) und TCR Va2 (PE) werden 100 µL beiseitegelegt.

9. Es wird für 7 Minuten bei 1700 RPM und 4°C zentrifugiert.

10. Die Zellen werden in 1X PBS 0.1% BSA gewaschen, erneut zentrifugiert, in einem bekannten Volumen resuspendiert und gezählt.

11. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen Spin  $10^7$  /mL in PBS 0.1% BSA, resuspendiert und mit „cell trace violet“ (1:1000) versetzt.

12. Es wird für 20 min bei 37 °C (Wasserbad) gefärbt und mit RPMI + 2% FCS für 5 min auf Eis gequenchet.

13. Die Zellen werden mit RPMI 2% FCS für 7 min bei 1700 RPM und 4°C gewaschen, in 2 mL RPMI + 2% FCS resuspendiert und gezählt

14. Es wird bei 1.700 RPM und 4°C für 7 min zentrifugiert.

15. Um zu prüfen, ob die Mehrheit der Zellen Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen sind wird eine FACS Reinheitsfärbung durchgeführt. Hierzu werden die OTI T Zellen für CD8 in 53-6.7 (AF488) und Vα2 in B20.1 (PE) gefärbt. Es wird eine Reinheit von  $\geq 90\%$  angestrebt.

16. Die Zellen werden in DC-Medium + 1:500 GM-CSF ( $5 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> T Zellen/200  $\mu$ L) resuspendiert.

#### CD8<sup>+</sup> T Zellen mit DCs kultivieren

1. Nach dem finalen Waschschrift der DCs werden 180  $\mu$ L des Überstands vorsichtig entfernt und  $5 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> T Zellen/200  $\mu$ L/„well“ zugegeben.
2. Es wird bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> für 60-72 Stunden inkubiert.
3. Die Platte wird bei 1.700 RPM und 4 °C für 2 min zentrifugiert.
4. Es wird mit 200  $\mu$ L EDTA/BSS gewaschen und im Anschluss mit 50  $\mu$ L CD8 in 53-6.7 (AF488) (1:200) für 30 min unter Lichtausschluss auf Eis gefärbt.
5. Nach Zugabe von 150  $\mu$ L EDTA/BSS und Zentrifugation wird ein zweites Mal mit 200  $\mu$ L EDTA BSS gewaschen.
6. Die Zellen werden in 100  $\mu$ L EDTA BSS PI (1:200) resuspendiert. Zu diesen werden 50  $\mu$ L einer 1:10 verdünnten Beadslösung in EDTA BSS PI (1:200) („Sphero Blank Calibration particles“ 6.0 – 6.4  $\mu$ m, BD Bioscience, Cat: 556296) zugegeben und mittels FACS analysiert.

## **7.9 Zelllokalisierungsexperimente**

### **Kammervorbereitung unter sterilen Bedingungen**

- 1) Jedes „well“ der Kammer wird mit 200  $\mu$ L einer PLL-Lösung (0,1 mg/mL) für 15 min beschichtet.
- 2) Die Lösung wird abgenommen und die Kammer für 30 min offen stengelassen.
- 3) Es werden 30  $\mu$ L des Antikörpers N22 (10  $\mu$ g/mL) in die Mitte jedes Wells gegeben und für 2 h bei 37 °C in den Inkubator gestellt.



- 4) Der Antikörper wird 2X mit 400-500  $\mu\text{L}$  PBS 2% FCS und 1X mit DC-Medium abgewaschen.
- 5) Anschließend werden die, wie in Abschnitt 7.6 beschrieben, isolierten DCs aufgetragen (250.000 Zellen in DC-Medium pro Well (10 Mio. Zellen pro 1 mL DC-Medium; 1:500 GMCFS)) und über Nacht bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> ausgereift.

### Hinzufügen der Konjugate

Tabelle 7-14: AF647-markierte Polymerkonjugate

Probe	N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx	N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-aDEC205	N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CpG	N <sub>3</sub> -PEtOx-b-PiPrOx-CpG-aDEC205
Menge/ $\mu\text{L}$	0.04	1.03	0.52	1.35

- 1) Die Konjugate werden für 2 h bei 37 °C inkubiert
- 2) Im Anschluss werden die Konjugate dreimal mit PBS gewaschen und mit 200  $\mu\text{L}$  3% Paraformaldehyd (PFA) für 15 Minuten auf Eis fixiert.
- 3) Es wird erneut dreimal mit PBS gewaschen, nach dem letzten Waschschrift wird mit PBS aufgefüllt und bei 4° C gelagert.

### Färbung mit LAMP-1, EEA-1 und RAB14

- 1) Jedes „well“ wird für 2 h mit Blockierungspuffer (3% BSA + 0,2 % Triton X-100 in PBS) versehen.
- 2) Anschließend erfolgt die Zugabe der in Blockierungspuffer verdünnten Antikörper:

Tabelle 7-15: Phänotypisierung

Phänotypisierung	Färbung	Verdünnung
CD8a	PE	1:300
CD11c	BV510	1:300
antiLAMP1	488	1:200
antiEEA1	488	1:200
antiRAB14	488	1:400

- 3) Es wird über Nacht bei 4 °C inkubiert und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen.
- 4) Es werden 150 µL des sekundären Antikörpers (Goat-anti-rabbit 488) zugegeben und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert.
- 5) Zum Abschluss wird dreimal mit einer Waschlösung (0.2 % BSA + 0.05% Triton X-100 in PBS) und einmal mit PBS gewaschen.

### 7.10 Probenvorbereitung für die Lichtstreuung (allgemein)

Für die Lichtstremessungen werden die Lichtstreküvetten jeweils 20-30 Minuten im Acetonbrunnen mit frisch destilliertem Aceton staubfrei gespült, in der „Flowbox“ getrocknet und befüllt um eine Kontamination mit Staub zu vermeiden. Die verschiedenen Polymerproben/Proteine werden je nach Probe über verschiedene Filter in die Lichtstreküvette gegeben. Die verwendeten Konzentrationen sowie Filter sind den Bildunterschriften zu entnehmen.

### 7.11 Präparation der Serumproben für die DLS, DLS an Polymeren bzw. Nanopartikeln in Serum

Die Präparation der Serum- und Serumproteinproben sowie die anschließende DLS an Polymeren/Nanopartikeln in Serum erfolgt nach der von Rausch et al. beschriebenen Methode.<sup>[144]</sup> Zu Beginn wird das bei -20 °C gelagerte humane Serum langsam aufgetaut. Dies sollte nach dem Auftauen nicht wieder eingeforen werden. Für die Lichtstremessungen wird das Serum mittels eines GS220 nm Filters (modifizierte Cellulose, Millipore, „Technical Support“ 2010) in die Lichtstreküvette überführt. Die Eignung dieses

Filters wurde in vorherigen Arbeiten von [REDACTED] untersucht. Die Lichtstreuküvetten werden wie in Abschnitt 7.10 beschrieben vorbereitet.

Die zu charakterisierenden Proben werden durch einen für die entsprechenden Partikel geeigneten Filter zum Serum gegeben. Hierbei wird das Konzentrationsverhältnis entsprechend dem Verhältnis zwischen Nanopartikel und Protein im *in vivo* Experiment gewählt. Bei einer nicht *in vivo* getesteten Proben, wird das Verhältnis der Konzentrationen so gewählt, dass die Intensität des Partikels nicht mehr als 10% von der Streuintensität des Serums in der Mischung abweicht. Um die Veränderungen der Einzelkomponenten (Serum/Partikel) in der Mischung zu bestimmen, wird das Serum sowie der Partikel unabhängig voneinander vermessen. Hierbei werden die Konzentrationen durch Verdünnung mit DPBS-Puffer (Invitrogen) oder 0,152 M NaCl Lösung (physiologischer NaCl Gehalt) auf die in der Mischung vorliegende Konzentration eingestellt.

### 7.12 Plasmafraktionierung

Unter Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden kann humanes Blutserum/Blutplasma fraktioniert werden. Die folgenden Protokolle wurden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] durchgeführt.

#### 7.12.1 Präparative Isolierung von IgG über Protein-A Affinitätschromatographie

Zur Isolierung von IgG wird eine Protein-A Chromatographiesäule (Tosoh Haas) eingesetzt. Diese wird in eine Flüssigchromatographie (LC, engl.: „liquid chromatography“) eingebaut und bei einem Fluss von 0,5 mL/min betrieben. Als Laufpuffer dient 10 mM Tris-Puffer, pH = 7,4. Vor Gebrauch wird die Protein-A Säule mittels 10 mL Laufpuffer, 2 mL 0,1 M NaOH, 2mL 0,2 M Zitronensäure und mit 2 mL 0,2 M Tris (pH =7,4) gereinigt. Anschließend wird noch einmal mit dem Laufpuffer gewaschen bis der pH-Wert bei pH = 7,4 liegt.

Das Plasma wird mit dem Laufpuffer (1:5) verdünnt und für 5 Minuten bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss werden 600 µL des verdünnten Plasmas manuell auf die Protein-A Säule aufgetragen. Die Säule wird erneut in die Flüssigkeitschromatographie eingebaut und für 4 Minuten mit dem Laufpuffer gespült. Die Erfassung des Durchflusses erfolgt in 1 mL Fraktionen. Das Eluat wird nach Aufgabe von 2 mL 0,2 M Zitronensäure mit

einem Fluss von 0,5 mL/min erhalten. In dieser Fraktion ist die Hauptmenge an IgG enthalten. Durch Zugabe von Tris-Base (pH = 11) wird der pH-Wert auf pH = 7,4 eingestellt.

### **7.12.2 Präparative Isolierung von Albumin über AffiBlue Affinitätschromatographie**

Albumin wird mittels einer „AffiBlue“ Säule (Tosoh Haas) isoliert. Auch hier wird die Säule wieder in eine LC-Apparatur eingebaut und mit einem Fluss von 0,5 mL/min betrieben. Als Laufpuffer dient 10 mM Tris (pH = 7,4). Vor Auftragung der Probe (Durchfluss der IgG-Säule) wird die Säule mit 10 ml destilliertem Wasser, 10 ml 2 M Guanidin in 10 mM Tris HCL und 10 ml 10 mM Tris HCL gereinigt. Die Auftragung der Probe auf die Säule erfolgt wieder manuell. Die Probe wird einmal rezirkuliert. Das nach der Rezirkulation erhaltene Eluat wird aufgefangen und als Eluat 1 gekennzeichnet. Die Säule wird nun mit 10 mM Tris HCL gespült und die Durchflüsse gesammelt (Durchfluss 2-4; 2x 500 µL und 1x 1 mL). Es folgt ein Waschschrift mit dem Laufpuffer für weitere drei Minuten. Im Anschluss erfolgt die Injektion von 2 mL 2M NaCl. In den nächsten 4 Minuten findet die Erfassung des Eluats statt (Eluat 1-2). Das dritte Eluat wird nach Auftragung von 2mL 2M Guanidin Lösung erhalten. Zum Abschluss wird noch einmal mit dem Laufpuffer gespült. Die Säule wird in 20%igem Ethanol bei 4 °C aufbewahrt.

### **7.12.3 DEAE Anionenaustauschchromatographie**

Zur Isolierung einer anionischen oder kationischen Proteinfraction dient eine DEAE-(Diethylaminocellulose)-Säule (Tosoh Haas). Zu Beginn wird diese mit 4 mL MilliQ-Wasser gespült. Im Anschluss werden 200 µL einer 0,5 M NaOH Lösung aufgegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Aufgabe von 500 µL Milli-Q Wasser und Abzug mittels einer Vakuumpumpe erfolgt die Auftragung von 500 µL einer 0,2 M NaCitrat Lösung (pH = 5,0). Die Säule wird für 10 Minuten mit dieser Lösung inkubiert und im Anschluss über eine Vakuumpumpe entfernt. Nach zweimaligen Wiederholen wird das Eluat der AffiBlue Säule nach einer 1:2 Verdünnung mit 20 mM NaCitrat (pH = 5,0) aufgegeben.

Nach Auftragung der Probe (500 µL) wird diese für 10min mit der Säule inkubiert. Der nach Abzug mittels Vakuum erhaltene Durchfluss wird noch einmal aufgetragen. Die kationische Proteinfraction wird aus dem Durchfluss nach Rezirkulation erhalten.

Nach einem Waschschrift mit mit 500 µl einer 20 mM NaCitrat Lösung (pH = 5,0) erfolgt die Elution mit Hilfe verschiedenen Salzlösungen:

Elution 1: 200 µl 0,155 M NaCl in 20 mM NaCitrat, pH = 5,0

Elution 2: 200 µl 0,3 M NaCl in 20 mM NaCitrat, pH = 5,0

Elution 3: 200 µl 0,5 M NaCl in 20 mM NaCitrat, pH = 5,0

Elution 4: 200 µl 1 M NaCl in 20 mM NaCitrat, pH = 5,0

Die Säule wird mit 500 µl der 1 M NaCl in 20mM NaCitrates, pH = 5,0 nachgespült und mit 1 ml MilliQ-Wasser gewaschen. Die Säule wird in 20%igem Ethanol bei 4 °C aufbewahrt

## 7.13 Verwendete Geräte und Methoden

### **Gelpermeationschromatographie**

Die Durchführung der GPC-Messungen erfolgt durch [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz. Der Antikörper aDEC205 sowie die aDEC205-Polymer Konjugate werden in wässrigem 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.04) Puffer bei einer Flussrate von 0.5 mL/min vermessen. Es werden SHODEX OH-PAK Säulen, 3 Säulen mit Vorsäule (SB 802.5 HQ 6 µm, 803 6 µm, 804 10 µm), Säulenmaße: 8 x 300 mm, Säulenmaterial: Polyhydroxymethacrylate verwendet. Es wird jeweils mit einem UV-Detektor des Typs Waters 486 (bei λ = 260nm und λ = 650 nm) und einem RI-Detektor des Typs Hitachi L-2490 detektiert.

Die Messungen werden bei 25 °C durchgeführt und es werden jeweils 20 µL eingespritzt.

Die Fraktionierung der N<sub>3</sub>-PEtOx-Polymerbürsten erfolgt in HFIP bei einem Fluss von 0.8 ml/ min. Es wird eine lineare 7µm MZ-Gel Super-FG Säule (300 x 8.0 mm) mit einer 50 µL Schleife verwendet.

### **Gelelektrophorese**

Die SDS-PAGE wird in einer „XCell Surelock“ Mini-Zelle (Invitrogen) mit NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris-Gelen durchgeführt. Als Laufpuffer dient 1x NUPAGE® SDS MOPS und die Bedingungen werden dem Standardprotokoll von *Invitrogen* entnommen.

### **NMR**

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen werden an einem Bruker 300 Ultra Shield der Universität Mainz gemessen. Als Lösungsmittel dienen  $\text{CDCl}_3$ , MeOD,  $\text{D}_2\text{O}$ , DMSO.

### **Lichtstreuung**

Die dynamischen sowie statischen Lichtstreuungsmessungen werden mittels der Folgenden angeführten Anlagen ausgeführt:

- 1) Goniometer SP-125 mit ALV/SO-SIPD Single Photon Detector (Lichtwellenleiter-Optik), ALV-5000/EPP/60X Multitau Realtime Digital Korrelator, alles von der Firma ALV, Langen, und ein Argon-Ionen-Laser (SpectraPhysics Stabilite 2060-4S, Wellenlänge 514,5 nm, Leistung 500 mW).
- 2) Helium-Neon Laser (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632,8 nm, Leistung 25 mW) und einer Detektionseinheit (Goniometer ALV-SP86, ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden, Faseroptikdetektionssystem, Digital Korrelator/Strukturator von der Firma ALV, Langen).
- 3) Helium-Neon Laser (Wellenlänge 632,8 nm, Leistung 25 mW) und einem ALV-CGS 8 F SLS/DLS 5022F Goniometer und acht Detektionseinheiten (acht gleichzeitig messenden ALF7004 Korrelatoren und acht QEAPF Avalanche Photodioden Detektoren).

Für alle Messungen werden Küvetten aus Quarzglas von der Firma Hellma, Mühlheim, mit einem Durchmesser von 20 mm und einem Volumen von 14 mL verwendet oder einem Durchmesser von 10 mm und einem Volumen von 4 mL.

Die Auswertung der dynamischen Lichtstreuungsmessungen erfolgt mit Hilfe des Programms HDRC.

### **UV-VIS-Spektrometrie**

Die UV/VIS-Messungen werden an einem Cary 100 Bio der Firma Varian gemessen. Die Messungen werden bei 25 °C in Helma Küvetten durchgeführt.

### **Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)**

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen werden von [REDACTED] am MPI für Polymerforschung in Mainz mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Geräts durchgeführt.

Dieses besteht aus einem inversem IX 70 Mikroskop, einem FluoView 300 konfokalem Laser (Olympus) und einer FCS Einheit (PicQuant), welche aus einer „single-photon“ Avalanche Diode und einer Zeit-korrelierten „single-photon counting card“ TimeHarp 200 besteht.

Die Anregung erfolgt entweder mittels eines Argon Lasers bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  (8 mW, CVI Melles Griot), wobei das Fluoreszenzsignal nach dem Filtern mit einem LP488R Raman Edge „long-pass“ Filter detektiert wird, oder über einen Helium-Neon Laser bei  $\lambda = 633 \text{ nm}$  (5 mW, CVI Melles Griot), Filter LP635R Raman Edge Langpassfilter. Für die Messung wird ein UPLSAPO 60 XW Objektiv (Olympus) verwendet. Die Proben werden in Polystyrol 8-Well-Kammer (Laboratory-Tek, Nalge Nunc International) vermessen.

### ***Fluoreszenzspektroskopie***

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgt mittels eines Jasco FP-6500 (ETC-273) Spektrometers (Seriennr. C065260822), welches mit der Software Fluorometer FP-6500 JASCO-SpectraManager, Spectrum Measurement ausgestattet ist.

### ***Rasterkraftmikroskopie***

Die in dieser Arbeit gezeigten AFM-Aufnahmen werden von [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz ausgeführt. Hierzu wird ein „MultiMode™ Scanning Probe Microscope“ mit einem „Nanoscope IIIa-Controller“ (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) verwendet. Es wird im „tapping™“-Modus gemessen. Für Messungen an getrockneten Proben werden Olympus OMCL-AC160-W2 Cantileverspitzen mit einer Resonanzfrequenz von 300 kHz (Federkonstante 42 N/m) verwendet. Für die Messungen werden die Proben bei einer Konzentration von 0.1 g/L oder 0.025 g/L in Wasser gelöst und im Anschluss durch „spin-casting“ auf frisch gespaltenes Mica aufgebracht.

### ***Konfokalmikroskopie (CLSM)***

Die Messungen werden am „Microscopy-Core-Facility“ des „Institute of Molecular Biology“ (IMB) in Mainz durchgeführt. Die Zellkerne werden mit Hoechst 33342 Lösung (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) angefärbt. Das Abbilden der Zellen erfolgt in „ibidi-Standard-Bottom/ $\mu$ -Slide-8-well“ (ibidi) unter der Verwendung eines TCS SP5 Konfokalmikroskops (Leica) und 405 nm (Hoechst 33342), 488 nm (Alexa Fluor® 488), 561 nm (Alexa Fluor® 546/568), 633 nm (Alexa Fluor® 647) Laserlinien.

Die Auswertung der Bilder erfolgt mit Hilfe der LAS-AF Software (Leica).

### **Durchflusszytometrie (FACS)**

Die FACS Messungen der Internalisationskinetiken werden an einem LSR Fortessa (BD Bioscience) am Institut für Mikrobiologie und Immunologie an der Universität Melbourne durchgeführt. Das LSR Fortessa Durchflusszytometer besitzt zur Anregung vier verschiedene Laser mit den Wellenlängen: 405 nm, 488 nm, 561 nm und 633 nm. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit 16 Fluoreszenzdetektoren. Das Gerät ist mit der DiVa Digital Software ausgestattet. Die Datenanalyse erfolgt mittels FlowJo. Alle anderen FACS Messungen werden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] und [REDACTED] am LSR II Durchflusszytometer (BD Bioscience) in der Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz, durchgeführt. Dieses besitzt Laser mit den Anregungswellenlängen 355 nm, 405 nm 488 nm und 633 nm.

### **Toxizitätstests**

Für die Toxizitätstests werden BM-DC und HEK293 Zellen verwendet. Die HEK293 Zellen (je  $2 \cdot 10^4/100 \mu\text{L}$ ) werden in Tripiklaten in „wells“ einer 96 „well culture plate“ ausgesät. Am nächsten Tag werden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Polymer enthaltenes Medium (cPolymer = 0,01 – 1 g/L) zugegeben. BMDCs werden im Polymer enthaltenen Zellmedium resuspendiert und ebenfalls in dreifacher Ausführung auf „wells“ einer 96 „well culture plate“ gegeben (je  $2 \cdot 10^4/100 \mu\text{L}$ ). Am nächsten Tag wird die Zellviabilität mit Hilfe eines MTT-Assays ermittelt. Die erhaltenen Daten werden jeweils auf die Überlebensrate unbehandelter Zellen normiert und von mindestens zwei unabhängigen Versuchen vereint.

Die Durchführung der Toxizitätstests erfolgt durch [REDACTED] an der Uniklinik Mainz.

### **In Vivo Imaging**

Zur Bestimmung der Körperverteilung *in vivo* werden BALB/c Mäuse mit IRDye800CW markierten Polymeren (je 150  $\mu\text{L}$ ) injiziert. Zur Kontrolle dienen unbehandelte BALB/c Mäuse. Die Mäuse werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 min - 7 Tage) überwacht. Hierzu werden die Mäuse in die Dunkelkammer des „IVIS Spectrum imaging system“ (Perkin Elmer) überführt und bei  $\lambda = 745 \text{ nm}$  angeregt.



Die bei  $\lambda = 800$  nm emittierten Fluoreszenzsignale für eine Integrationszeit von drei Sekunden werden als mittlere Strahlungseffizienz mittels der „Living Image Software“ (Perkin Elmer) quantifiziert.

Für die *ex vivo* Organ-Aufnahmen werden die Mäuse 24 h bzw. 7 Tage nach Injektion getötet und die Fluoreszenzintensität der herausgeschnittenen Organen wird wie bereits zuvor beschrieben gemessen.

Zur Bestimmung der Blutzirkulationszeiten werden der Maus nach Injektion der Polymere zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 50  $\mu$ L Blut entnommen und in einer „black plate“ für drei Sekunden mit 745/800 ex/em Filtern vermessen. Für die Messung des Nullpunkts wird ein totales Blutvolumen von 1,5 mL angenommen. Es werden jeweils 15  $\mu$ L Polymer zu 150  $\mu$ L Blut gegeben und vermessen.

## 8 Anhang

Zu Kapitel 5.1.1

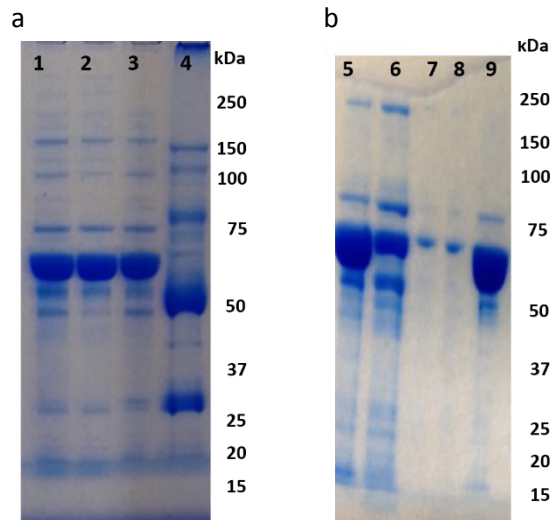


Abbildung 8-1: Fraktionierung von IgG (a) sowie Albumin (b) aus Plasma; 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (reduzierend): (a) nach Protein A –Säule: Tasche 1-3: Durchfluss 1-3 der Protein A Säule, Tasche 4: IgG-Fraktion; (b) nach Affi-Blue Säule: Tasche 5: Durchfluss IgG; Tasche 6-8: Durchfluss 2-4; Tasche 9: Albumin-Fraktion; Auftragsmenge ist jeweils 10 µg Protein

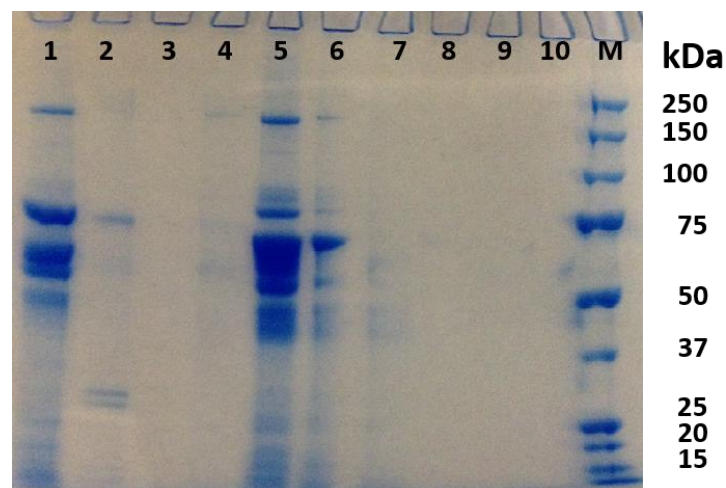


Abbildung 8-2: Abtrennung kationischer sowie anionischer Proteinfractionen aus Plasma; 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE nach DEAE-Säule: Tasche 1: Durchfluss der DEAE Säule, Tasche 2: kationische Proteinfraction , Tasche 3: Waschschrift, Tasche 4-8: anionische Proteinfraction, Tasche 9,10: Waschschrift, Tasche M: Marker ALL Blue (Biorad).

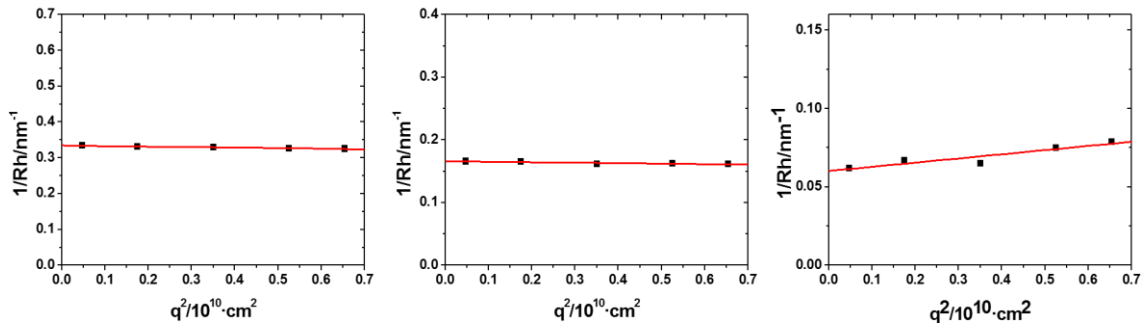


Abbildung 8-3: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius (a) BSA,  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 3 \text{ nm}$ ; (b) IgG,  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 6 \text{ nm}$  und (c) anionische Proteinfraction,  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 16.6 \text{ nm}$ ; in 1X PBS Puffer, Filter: GS 220 nm,  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T=293 \text{ K}$ .

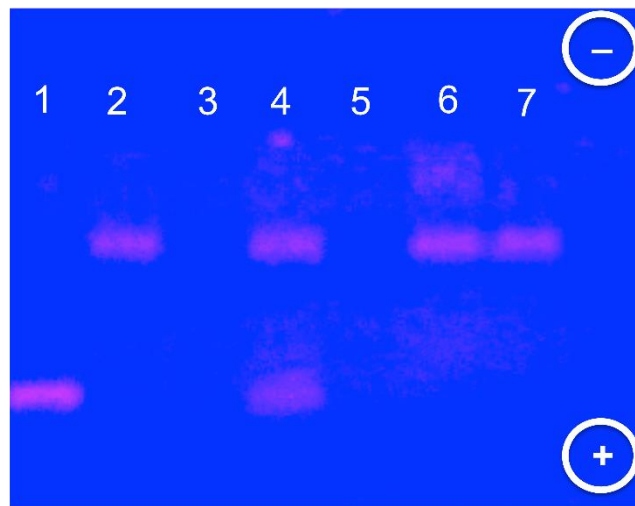


Abbildung 8-4: Agarose Gelelektrophorese der siRNA beladenen Nanohydrogelpartikel in humanem Serum – 1: 70 ng siRNA; 2: Serum; 3: 3.5 µg NP; 4: 70 ng siRNA in Serum; 5: NP:siRNA=25:1 (1.75 µg NP + 70 ng siRNA); 6: NP:siRNA=25:1 (1.75 µg NP + 70 ng siRNA) in Serum; 7: 1.75 µg NP in Serum.

Zu Kapitel 5.2.1

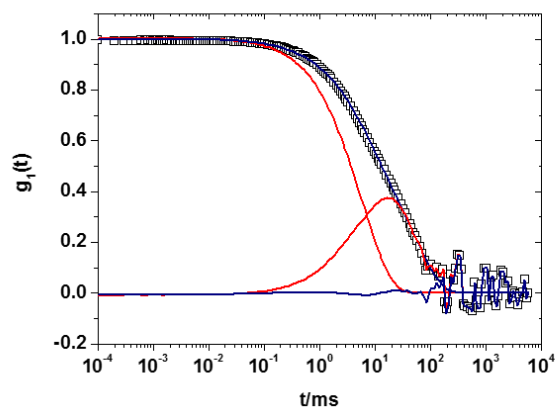


Abbildung 8-5: ○ AKF von PLL in Serum --- Forcfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion;  $R_h(\text{AGG}) = 500 \text{ nm}$ ; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c = 1 \text{ g/L}$ , Filter: GHP 200 nm; GS 220 nm;  $c = 1 \text{ g/L}$ ;  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T=293 \text{ K}$ .

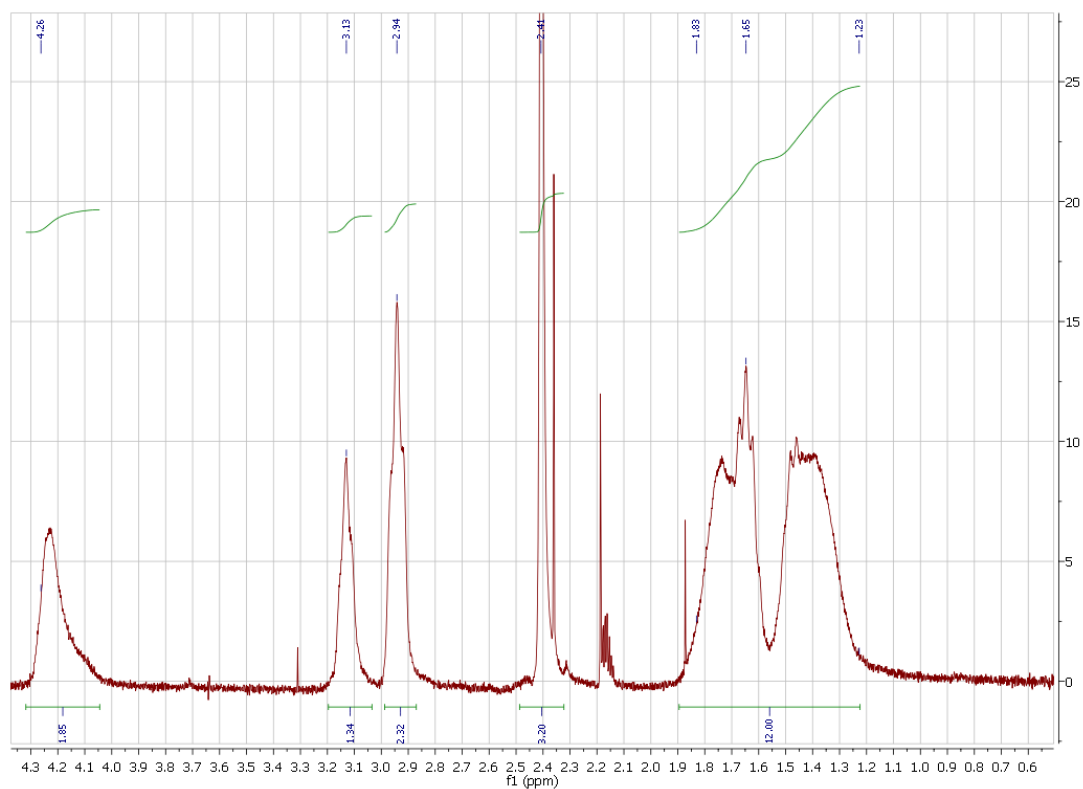


Abbildung 8-6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 37%-succinyliertes PLL in  $\text{D}_2\text{O}$

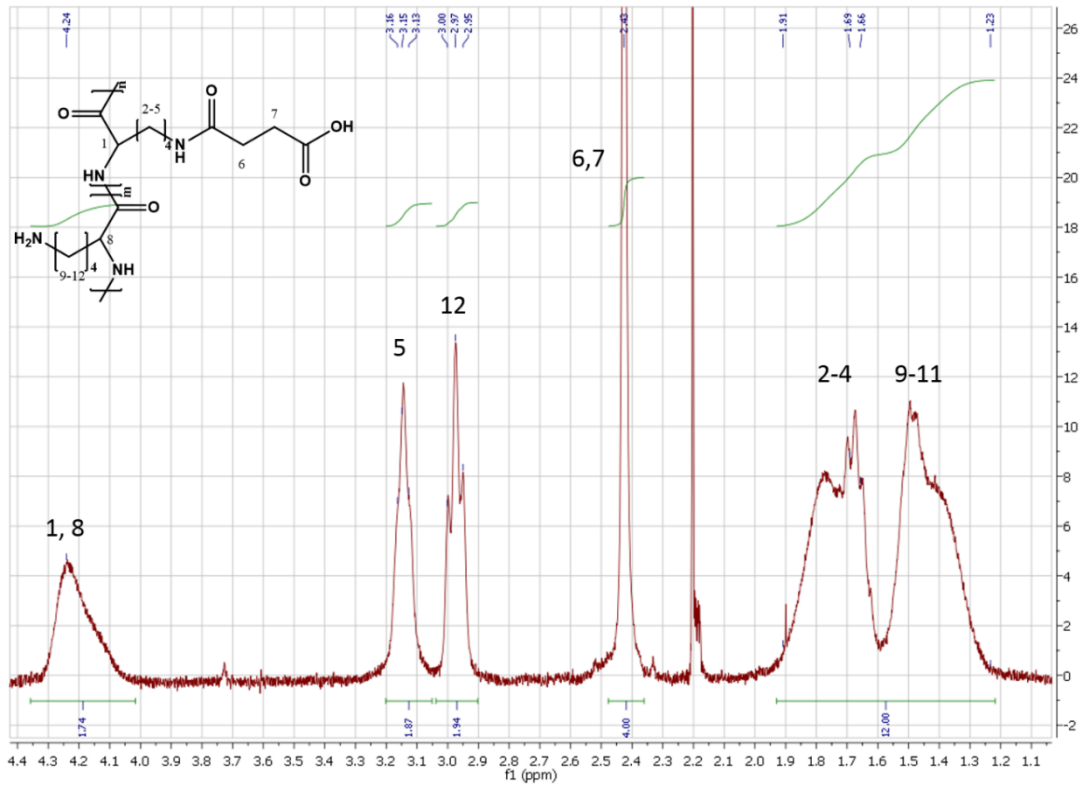


Abbildung 8-7:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 49%-succinyliertes PLL in  $\text{D}_2\text{O}$

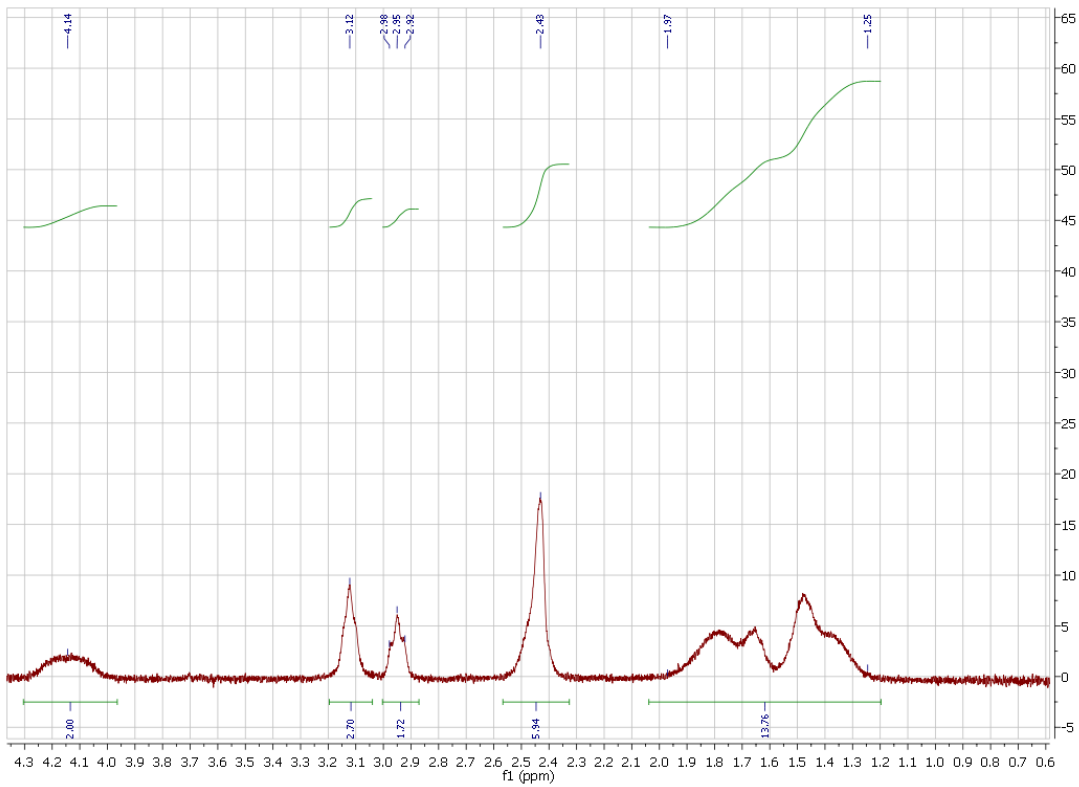


Abbildung 8-8:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 60%-succinyliertes PLL in  $\text{D}_2\text{O}$

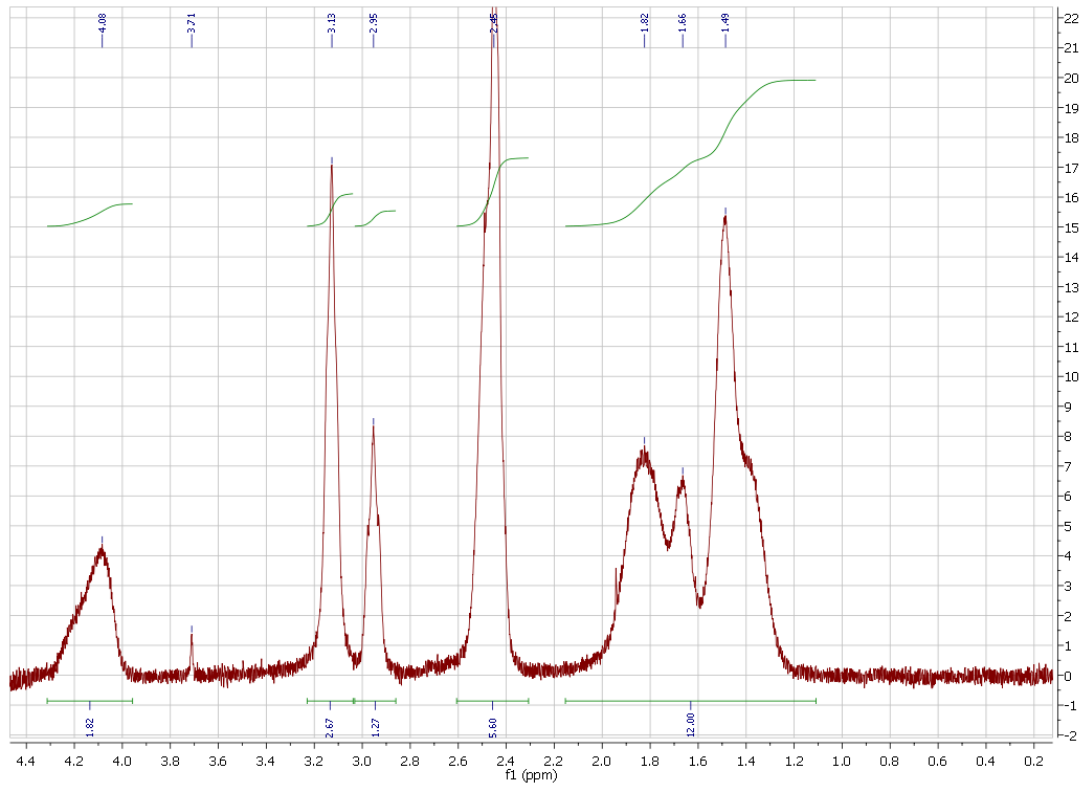


Abbildung 8-9:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 70%-succinyliertes PLL in  $\text{D}_2\text{O}$

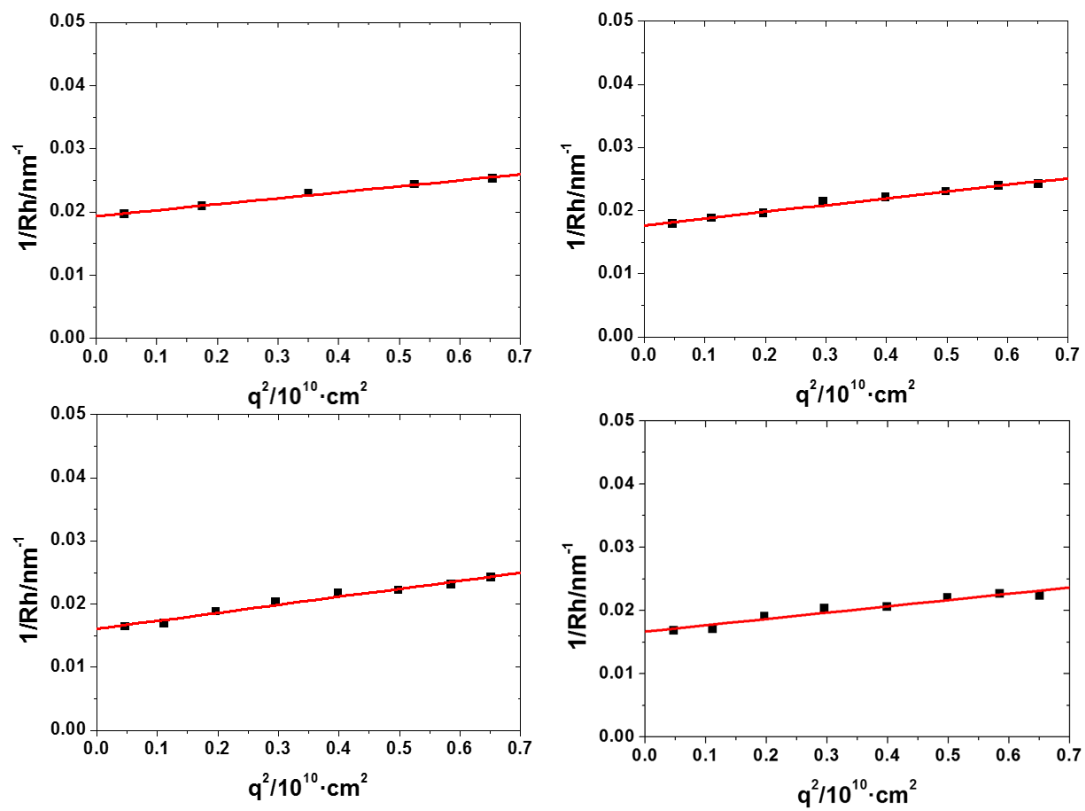


Abbildung 8-10: Winkelabhängigkeit des reziproken hydrodynamischen Radius von (a) PLL-Bürste ( $55\text{-}3$ )  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 51.7 \text{ nm}$ , (b) 20% Succ-PLL-Bürste  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 57 \text{ nm}$ , (c) 37% Succ-PLL-Bürste  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 62 \text{ nm}$  und (d) 50% Succ-PLL-Bürste  $\langle 1/Rh \rangle_z^{-1} = 59.9 \text{ nm}$  in 1X PBS Puffer,  $c = 0.05 \text{ g/L}$ , Filter: GHP 450 nm,  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ,  $T = 293 \text{ K}$ .

Zu Kapitel 5.4.1

PLL-aDEC205

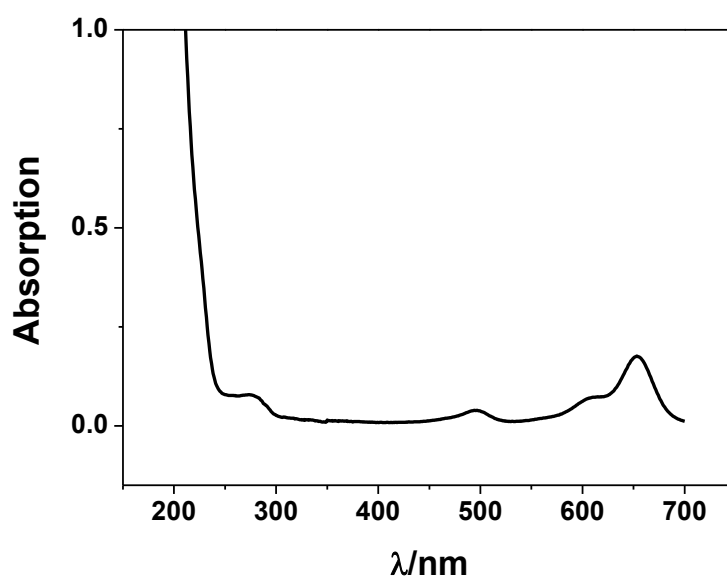
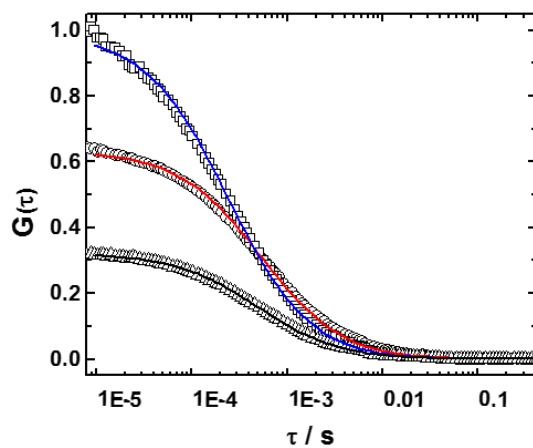


Abbildung 8-11: UV-VIS Spektrum PLL-AF488-aDEC205-AF647-1:1; in 1X PBS, VF = 15

a



b

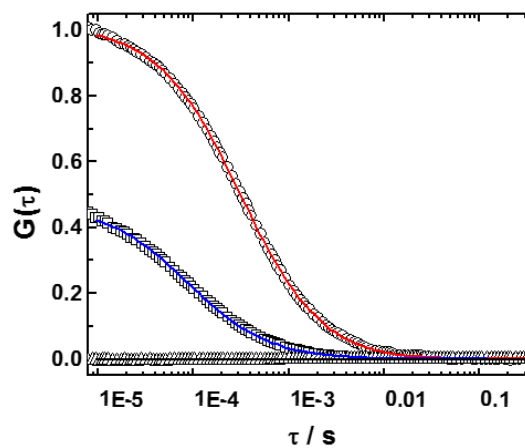


Abbildung 8-12: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen: (a) --- Blauer Kanal (PLL-AF488 + PLL-AF488-aDEC205-AF647 Konjugat); --- Roter Kanal (aDEC205-AF647 + PLL-AF488-aDEC205-AF647 Konjugat) und Kreuzkorrelation --- PLL-AF488-aDEC205 Konjugat; (b) Negativkontrolle: --- Blauer Kanal PLL-AF488; --- Roter Kanal aDEC205-AF647 und Kreuzkorrelation --- Mischung PLL-AF488 und unmodifizierter aDEC205-AF647 in 1X PBS, T= 295.15 K.

Tabelle 8-1: Nach FCS ermittelte hydrodynamische Radien

Kanal	PLL-AF488-aDEC205-AF647		Negativkontrolle	
	Rh/nm	c/ nM	Rh/nm	c/nM
<b>Rot (633 nm)</b>	$8.54 \pm 0.19$	$0.54 \pm 0.01$	$4.99 \pm 0.11$	$1.11 \pm 0.022$
<b>Blau (488 nm)</b>	$4.95 \pm 0.11$	$0.42 \pm 0.01$	$1.80 \pm 0.04$	$2.9 \pm 0.09$
<b>Kreuzkorrelation</b>	$8.92 \pm 0.14$	$0.18 \pm 0.01$	-	0

37%-succ-PLL-aDEC205

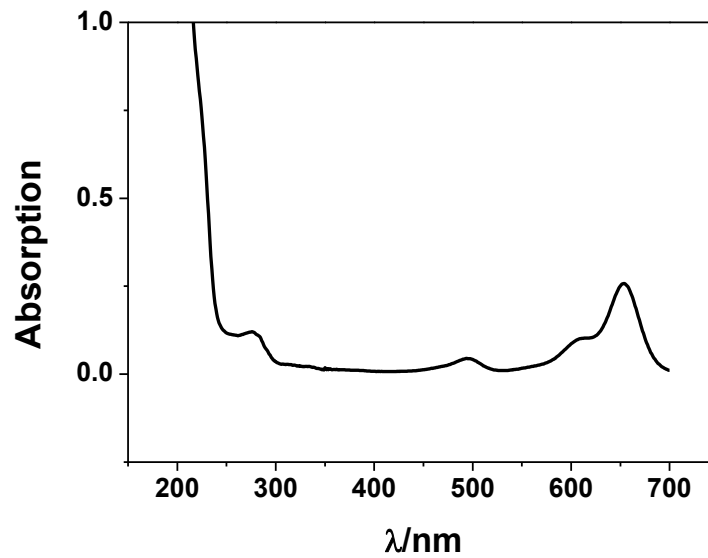
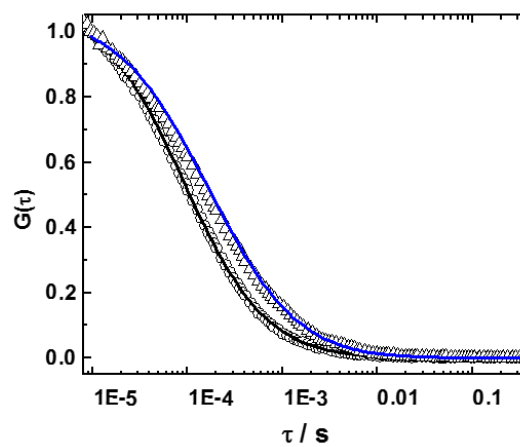


Abbildung 8-13: UV-VIS Spektrum 37%-succ-PLL-AF488-aDEC205-AF647-1:1; in 1X PBS, VF = 14

Abbildung 8-14: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- 37%-succ-PLL-AF488 und --- 37%-succ-PLL-AF488-aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ,  $T = 295.15 \text{ K}$ .



37%-succ-PLL-Bürste-aDEC205

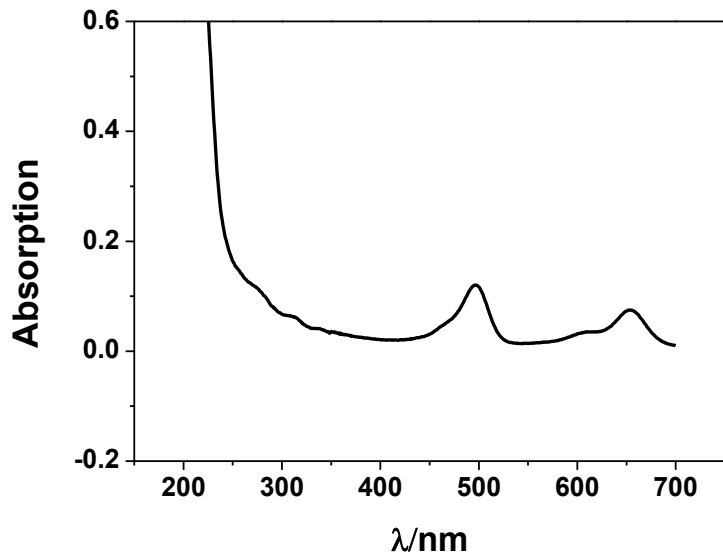


Abbildung 8-15: UV-VIS Spektrum 37%-succ-PLL-AF488-Bürste-aDEC205-AF647-1:1; in 1X PBS, VF = 14

50%-succ-PLL-Bürste-aDEC205

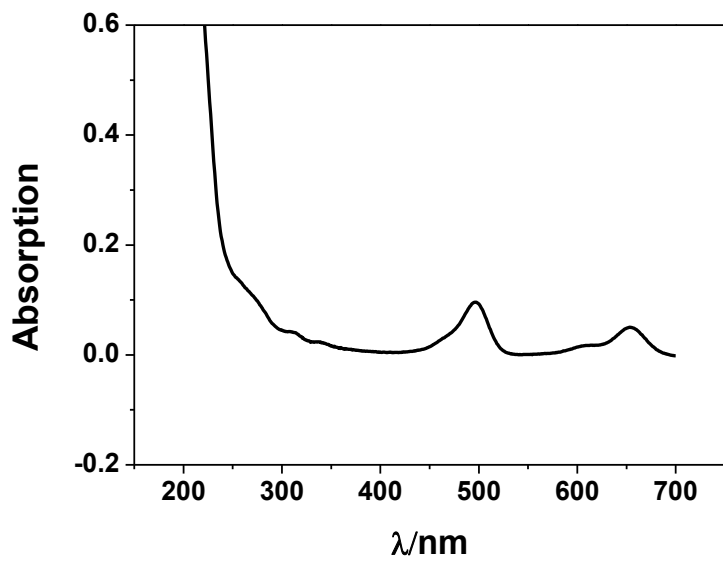


Abbildung 8-16: UV-VIS Spektrum 50%-succ-PLL-AF488-Bürste-aDEC205-AF647-1:1; in 1X PBS, VF = 14

Zu Kapitel 5.4.2  
*N*<sub>3</sub>-PEtOx-aDEC205

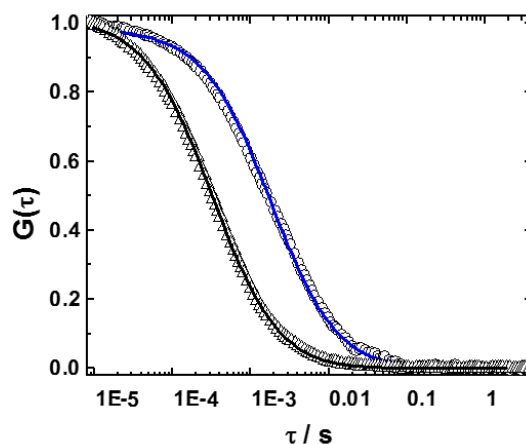


Abbildung 8-17: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen --- aDEC205-AF647 und --- *N*<sub>3</sub>-PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647 in 1X PBS,  $\lambda = 633$  nm, T= 295.15 K.

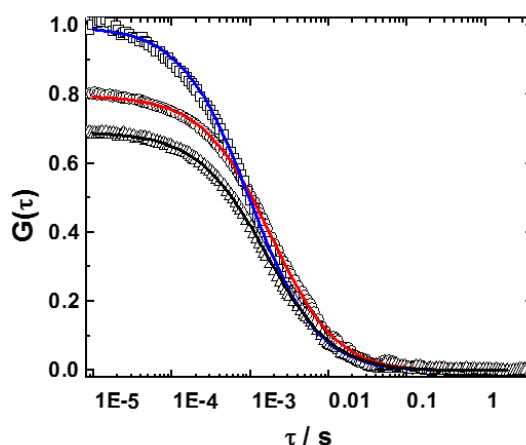


Abbildung 8-18: FCS Autokorrelationsfunktionen und deren entsprechenden Fitfunktionen: --- Blauer Kanal (*N*<sub>3</sub>-PEtOx-CRh110 + *N*<sub>3</sub>-PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647 Konjugat); --- Roter Kanal (aDEC205-AF647 + *N*<sub>3</sub>-PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647 Konjugat) und Kreuzkorrelation --- *N*<sub>3</sub>-PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647 Konjugat; in 1X PBS, T= 295.15 K.

Tabelle 8-2: Nach FCS ermittelte hydrodynamische Radien

Kanal	<i>N</i> <sub>3</sub> -EtOx-AF488-aDEC205-AF647		Negativkontrolle	
	Rh/nm	c/ nM	Rh/nm	c/nM
<b>Rot (633 nm)</b>	29.3 ± 0.66	0.28 ± 0.006	4.4 ± 0.9	1.24 ± 0.026
<b>Blau (488 nm)</b>	21.4 ± 0.48	0.25 ± 0.007	2.5 ± 0.9	0.53 ± 0.015
<b>Kreuzkorrelation</b>	28.6 ± 0.45	0.21 ± 0.008	-	-0.01 ± -0.000

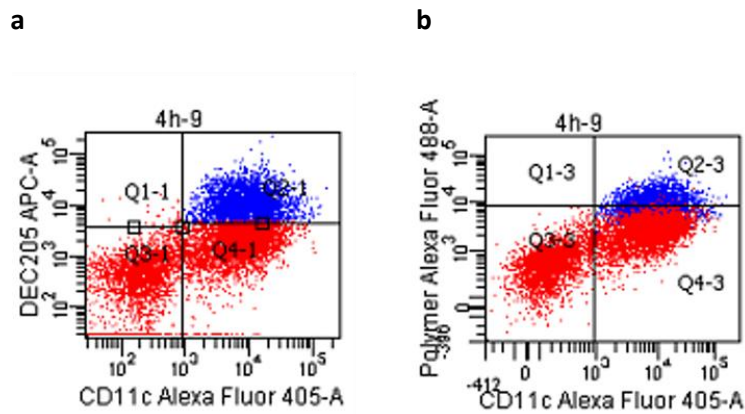


Abbildung 8-19: FACS-Messung;  $N_3$ -PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647; (a) APC-Kanal (AlexaFluor647); (b) AlexaFluor488 Kanal; blau = DCs, welche aDEC205 gebunden/aufgenommen haben.

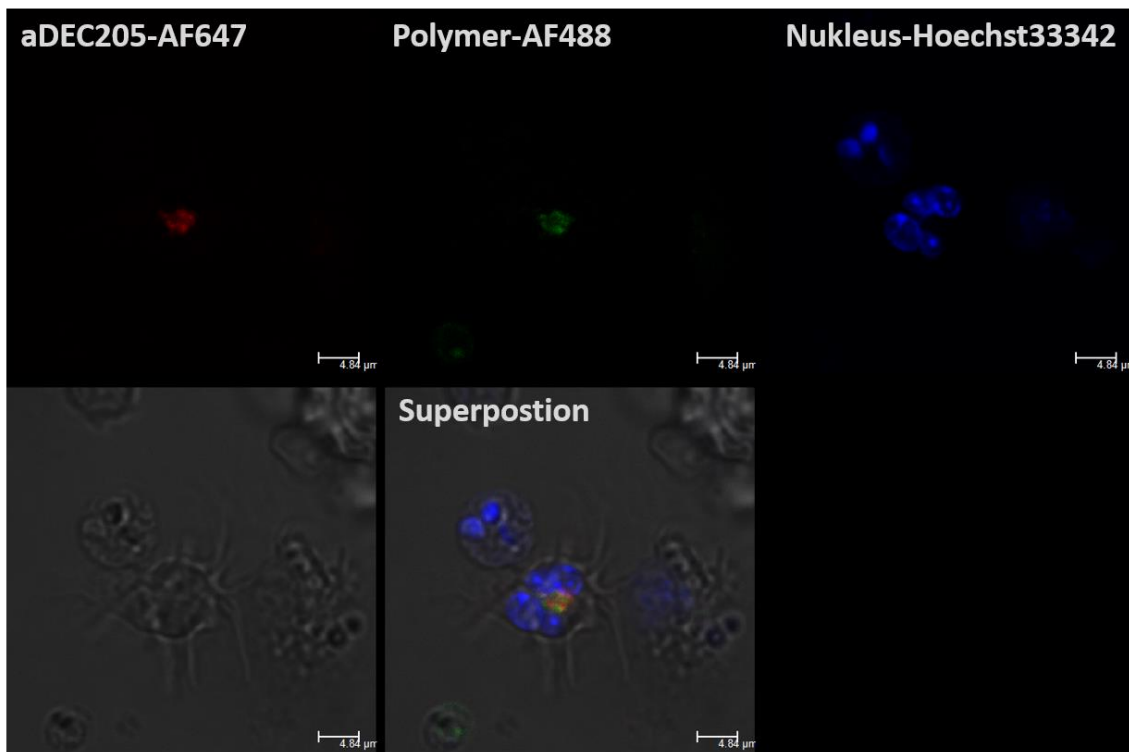


Abbildung 8-20: CLSM Aufnahmen an BMDCs: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; blau: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer ( $N_3$ -PEtOx-CRh110); gelb-orange: Kolokalisation (Konjugat:  $N_3$ -PEtOx-CRh110-aDEC205-AF647); Maßstabbalken: 4.84  $\mu\text{m}$ .

Zu Kapitel 5.4.3

### Internalisierungskinetik SHIP

Die totale Anzahl der von der Zelle internalisierten Proben wird nach folgender Formel erhalten:

$$\text{Totale Internalisation} = \frac{I(\text{gequencht}, t=i) - I(\text{gequencht}, t=0)}{\text{Anzahl Fluorophore (Cy5)}} \quad (\text{Gl. 8-1})$$

### $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5

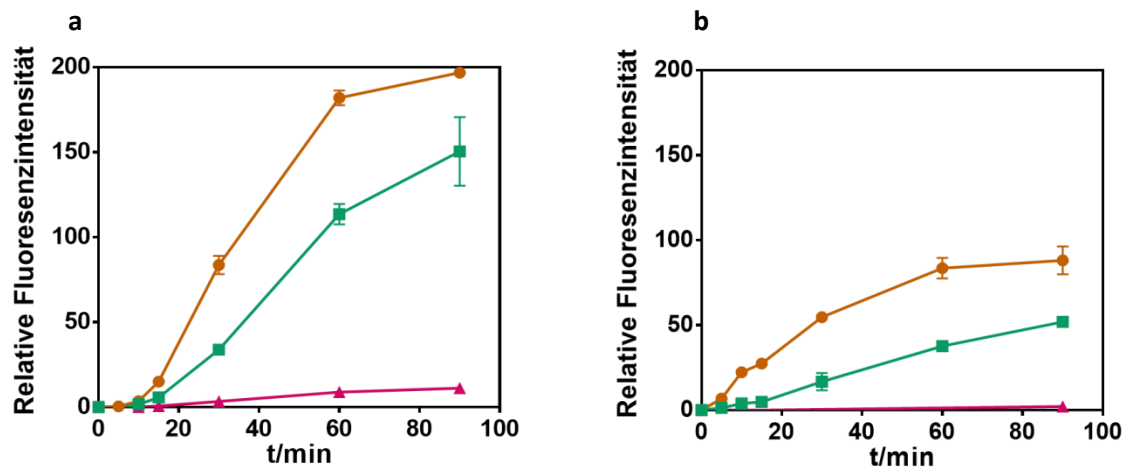


Abbildung 8-21: Totale Internalisierungskinetik von  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5,  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aDEC205 und  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCy5-aCD11c Konjugate in CD8+ DCs a) unreife DCs; b) reife DCs.

### $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-FIPCpGCy5

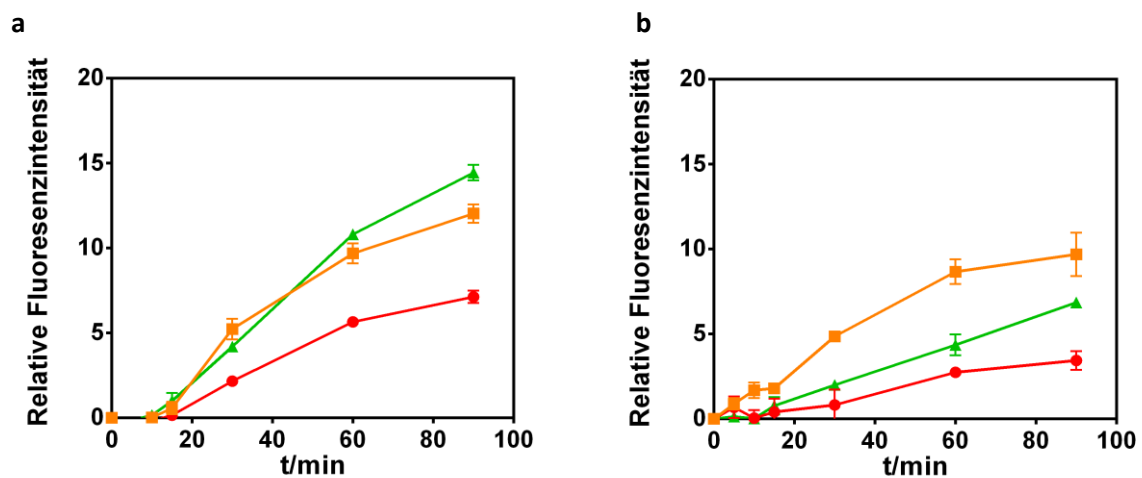


Abbildung 8-22: Totale Internalisierungskinetik von  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGFIP,  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGFIP-aDEC205 und  $\bullet$   $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpGFIP-aCD11c Konjugate in CD8+ DCs a) unreife DCs; b) reife DCs.

Zu Kapitel 5.4.4

*N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen*

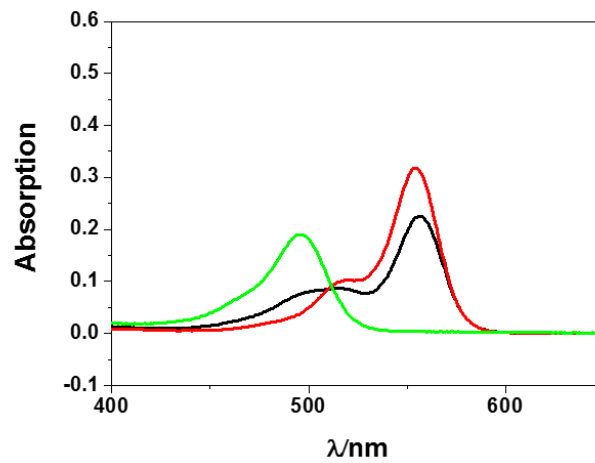
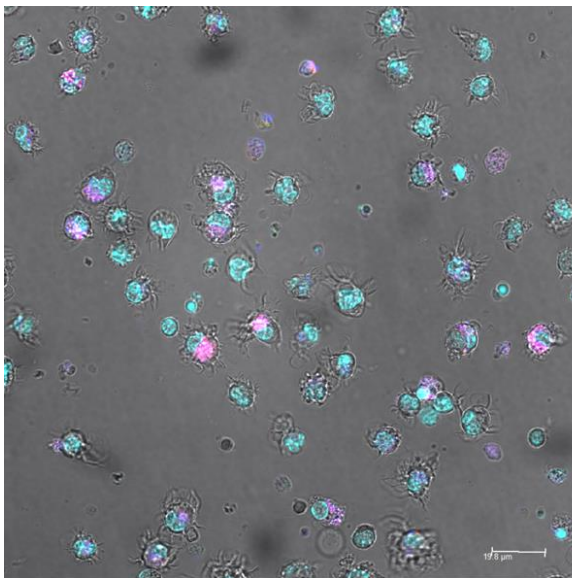


Abbildung 8-23: UV-VIS Spektrum von ● *N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488*, ● *Antigen-AF546* und ● *N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Antigen-AF546*

*N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aDEC205*

a



b

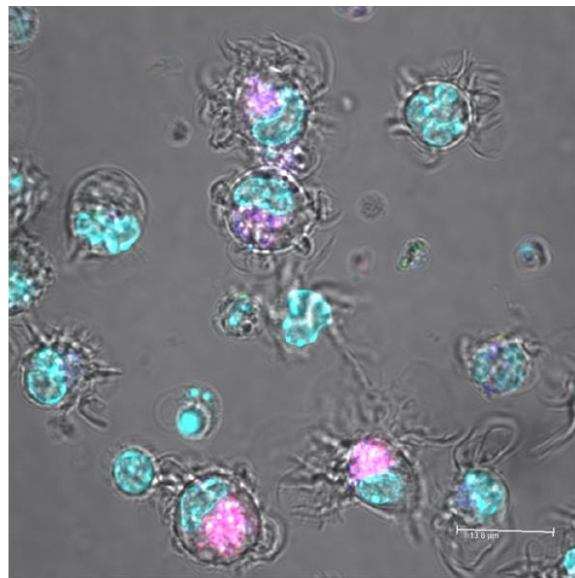


Abbildung 8-24: CLSM Aufnahmen an BMDCs: Zellen in 1X PBS, nicht-fixiert, Inkubationszeit 4h, Konzentration:  $1 \cdot 10^{12}$  Partikel/ $5 \cdot 10^5$  Zellen; türkis: Hoechst 33342-Nukleus; rot: aDEC205-AF647; grün: Polymer (*N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488*); blau: Antigen-AF546; pink: Mischung/Kolokalisation (Konjugat: *N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-AF488-Antigen-AF546-aDEC205-AF647*); Maßstabbalken: (a) 19.8  $\mu\text{m}$  und (b) 13.8  $\mu\text{m}$ .

Zu Kapitel 5.4.7

$N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG

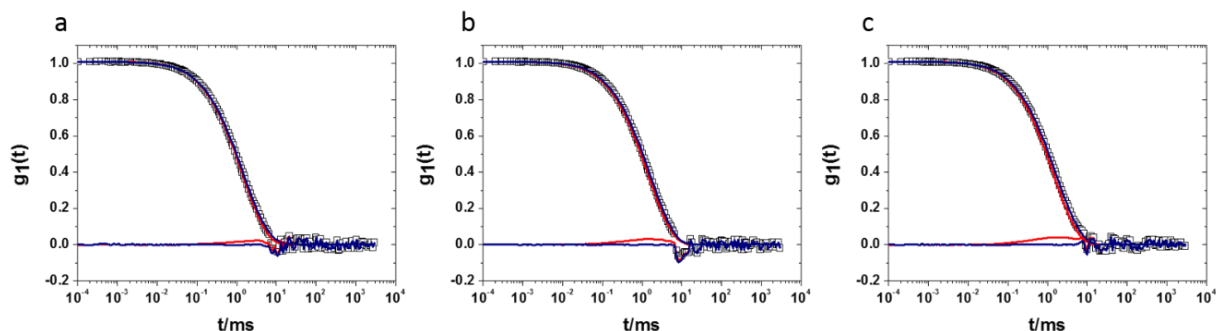


Abbildung 8-25: □ AKF von  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-CpG in Serum; (a) –CpG (1),  $R_h(\text{AGG}) = 160$  nm (4%), (b) – CpG (5),  $R_h(\text{AGG}) = 156$  nm (8%), und (c) – CpG (10),  $R_h(\text{AGG}) = 185$  nm (10%); --- Forcefit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymer; --- Fit nach Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum, Polymer und zusätzlicher aggregatbeschreibender Funktion; Streuwinkel  $30^\circ$ ;  $c=0.05$  g/L; Filter: LCR 450 nm; GS 220 nm;  $\lambda = 632.8$  nm,  $T=293$  K.

Zu Kapitel 5.4.9

T-Zellproliferation an reifen Milz-DCs

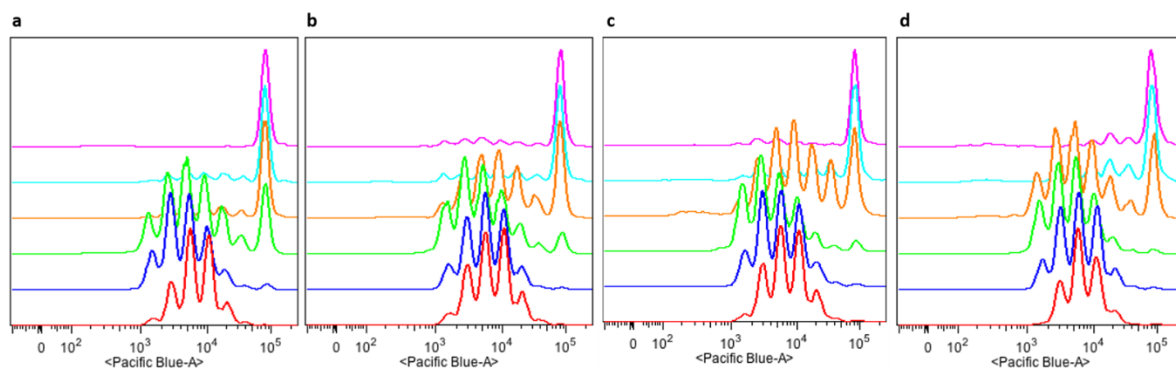
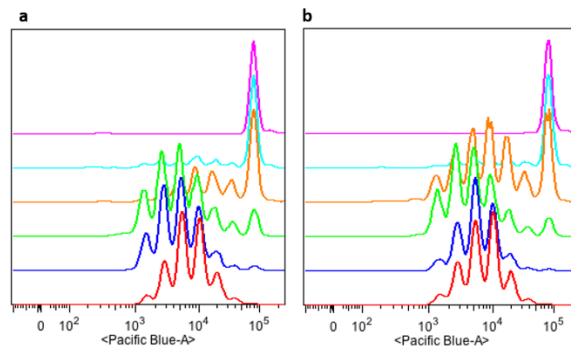
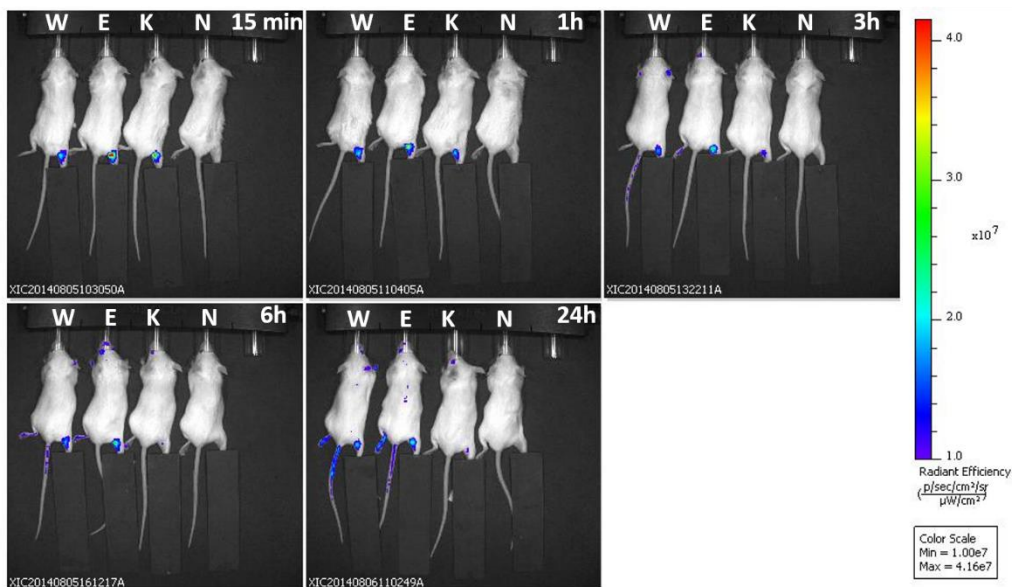


Abbildung 8-26: Verteilung des T-Zell Proliferationsfarbstoffs („Cell Trace Violet“) bei verschiedenen Antigenkonzentrationen; --- 1E-12M; --- 1E-11M; --- 1E-10M; --- 1E-9M; --- 1E-8M; --- 1E-7M; (a)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen; (b)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG; (c)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aDEC205; (d)  $N_3$ -PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG-aDEC205.



**Abbildung 8-27:** Verteilung des T-Zell Proliferationsfarbstoffs („Cell Trace Violet“) bei verschiedenen Antigenkonzentrationen; **—** 1E-12M; **—** 1E-11M; **—** 1E-10M; **—** 1E-9M; **—** 1E-8M; **—** 1E-7M; (a) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-aCD11c; (b) N<sub>3</sub>-PEtOx-b-PiPrOx-Antigen-CpG-aCD11c.

Zu Kapitel 5.5.3



**Abbildung 8-28:** Zeitabhängige Körperverteilung der verschiedenen Fraktionen der N<sub>3</sub>-EtOx-Bürste-CW800 (Wurmartige Bürste – (W); Ellipsoidfraktion – (E); Kugelfraktion –(K)) nach sukutaner Injektion in BALB/c Mäusen. Es wurden jeweils 50  $\mu$ L einer 1.87  $\mu$ M Polymerlösung (3.75  $\mu$ M CW800-IR-Farbstoff) subkutan in den Fuß der Maus injiziert. Die jeweils mit N gekennzeichnete Maus ist eine Kontrolle.

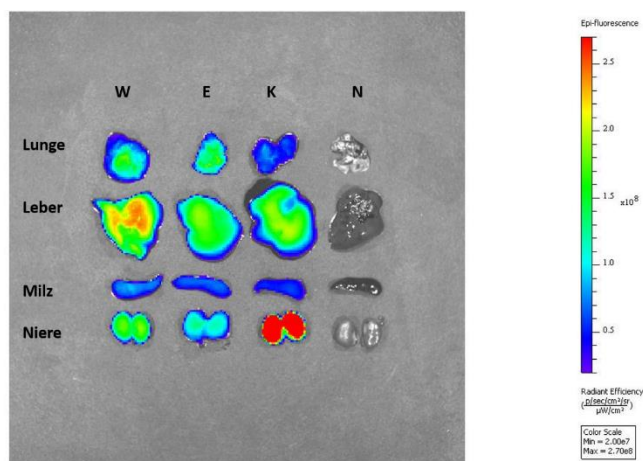


Abbildung 8-29: Körperverteilung der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste-CW800 (Wurmartige Bürste – (W); Ellipsoidfraktion – (E); Kugelfraktion –(K)) nach 24 h in BALB/c Mäusen; Retroorbitale Injektion; Es wurden jeweils 150  $\mu\text{L}$  einer 1.87  $\mu\text{M}$  Polymerlösung (3.75  $\mu\text{M}$  CW800-IR-Farbstoff) injiziert. Die jeweils mit N gekennzeichneten Organe dienen als Kontrollen.

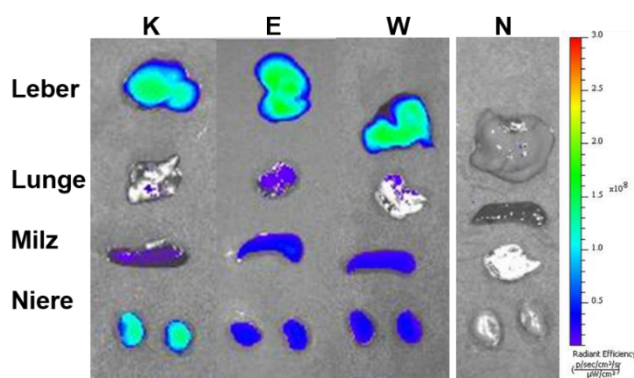
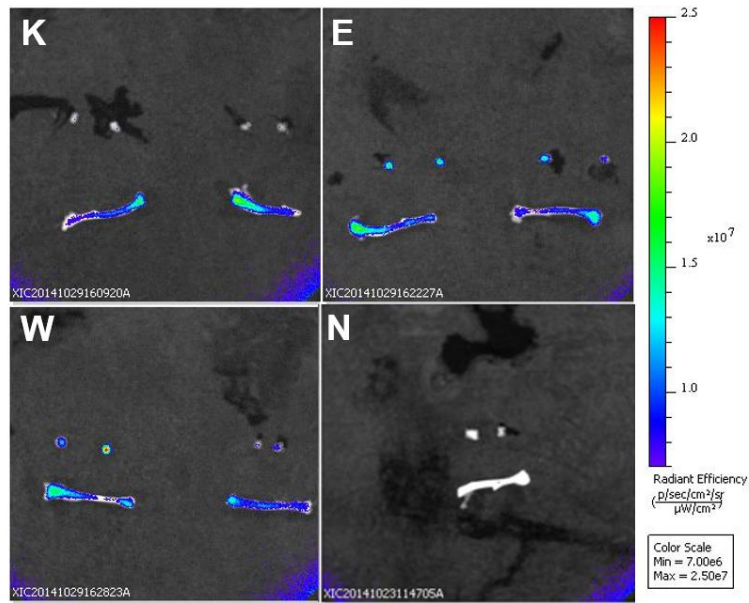


Abbildung 8-30: Körperverteilung der verschiedenen Fraktionen der  $N_3$ -PEtOx-Bürste-CW800 (Wurmartige Bürste – (W); Ellipsoidfraktion – (E); Kugelfraktion –(K)) in BALB/c Mäusen nach 7 Tagen; Retroorbitale Injektion. Es wurden jeweils 150  $\mu\text{L}$  einer 1.25  $\mu\text{M}$  Polymerlösung (3.75  $\mu\text{M}$  CW800-IR-Farbstoff) injiziert. Die jeweils mit N gekennzeichneten Organe dienen als Kontrollen.





**Abbildung 8-31:** Anreicherung der verschiedenen Fraktionen der N<sub>3</sub>-PEtOx-Bürste-CW800 (Wurmartige Bürste – (W); Ellipsoidfraktion – (E); Kugelfraktion –(K)) in den Lymphknoten und Knochen von BALB/c Mäusen, nach 7 Tagen; Retroorbitale Injektion; Es wurden jeweils 50  $\mu$ L einer 1.25  $\mu$ M Polymerlösung (3.75  $\mu$ M CW800-IR-Farbstoff) retroorbital injiziert. Die mit N gekennzeichneten Lymphknoten und Knochen dienen als Kontrolle.

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (15.11.2014)
- [2] [www.krebsinformationsdienst.de](http://www.krebsinformationsdienst.de). (15.11.2014)
- [3] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *Eur J Pharm Sci*, **2013**, *48*, 416.
- [4] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, *Angew Chem* **2014**, *126*, 12520.
- [5] H. Ringsdorf, *J. Polymer Sci* **1975**, *51*, 135.
- [6] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *Eur J Pharm Sci* **2013**, *48*, 416.
- [7] L. E. Paulis, S. Mandal, M. Kreutz, C. G. Figdor, *Curr Opin Immunol* **2013**, *25*, 389.
- [8] A. Reuter, "Towards Antibody-mediated Targeting of Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy with Multivalent Polymer-Antigen Conjugates", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2013**.
- [9] M. Kreutz, B. Giquel, Q. Hu, R. Abuknesha, S. Uematsu, S. Akira, F. O. Nestle, S. S. Diebold, *PLoS One* **2012**, *7*, e40208.
- [10] K. Rausch, "Interaktions- und Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in Blutserum", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2013**.
- [11] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, "Janeway Immunologie", 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.
- [12] M. Gi, W. Im, S. Hong, *Sensors (Basel)* **2009**, *9*, 6730.
- [13] G. Dranoff, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 11.
- [14] C. Olive, *Expert Rev Vaccines* **2012**, *11*, 237.
- [15] J. Parkin, *The Lancet* **2001**, *357*, 1777.
- [16] P. J. Delves, I. M. Roitt, *N Engl J Med* **2000**, *343*, 37.
- [17] P. J. Delves, I. M. Roitt, *N Engl J Med* **2000**, *343*, 108.
- [18] T. W. LeBien, T. F. Tedder, *Blood* **2008**, *112*, 1570.
- [19] I. R. Lemischka, D. H. Raulet, R. C. Mulligan, *Cell* **1986**, *45*, 917.
- [20] P. Christen, R. Jaussi, "Biochemie", Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Springer, **2004**.
- [21] R. M. Steinman, D. Hawiger, M. C. Nussenzweig, *Annu Rev Immunol* **2003**, *21*, 685.
- [22] R. M. Steinman, Z. A. Cohn, *J Exp Med* **1973**, *137*, 1142.
- [23] J. W. Young, R. M. Steinman, *J Immunol Methods* **1987**, *100*, 99.
- [24] J. J. Linderman, T. Riggs, M. Pande, M. Miller, S. Marino, D. E. Kirschner, *J Immunol* **2010**, *184*, 2873.
- [25] N. Fazilleau, L. Mark, L. J. McHeyzer-Williams, M. G. McHeyzer-Williams, *Immunity* **2009**, *30*, 324.
- [26] T. Kamradt, K. Ferrari-Kuhne, *Dtsch Med Wochenschr* **2011**, *136*, 1678.
- [27] J. A. Gonzalo, T. Delaney, J. Corcoran, A. Goodearl, J. C. Gutierrez-Ramos, A. J. Coyle, *J Immunol* **2001**, *166*, 1.
- [28] E. Gilboa, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 401.
- [29] G. T. Belz, A. Kallies, *Curr Opin Immunol* **2010**, *22*, 279.
- [30] R. M. Steinman, Z. A. Cohn, *J Exp Med* **1974**, *139*, 380.
- [31] J. A. Villadangos, P. Schnorrer, *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 543.
- [32] K. Palucka, J. Banchereau, *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 265.
- [33] <http://www.uni-ulm.de/expane/images/dendritic.jpg> (17.11.2014)
- [34] L. C. Zaba, J. G. Krueger, M. A. Lowes, *J Invest Dermatol* **2009**, *129*, 302.
- [35] M. Merad, M. G. Manz, *Blood* **2009**, *113*, 3418.
- [36] M. Colonna, A. Krug, M. Cella, *Curr Opin Immunol* **2002**, *14*, 373.

- [37] S. S. Diebold, *Handb Exp Pharmacol* **2009**, 3.
- [38] J. A. Villadangos, W. R. Heath, *Semin Immunol* **2005**, 17, 262.
- [39] G. T. Belz, S. L. Nutt, *Nat Rev Immunol* **2012**, 12, 101.
- [40] G. J. Randolph, V. Angeli, M. A. Swartz, *Nat Rev Immunol* **2005**, 5, 617.
- [41] D. Vremec, J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, K. Shortman, *J Immunol* **2000**, 164, 2978.
- [42] K. Liu, M. C. Nussenzweig, *Immunol Rev* **2010**, 234, 45.
- [43] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia, *J Exp Med* **1995**, 182, 389.
- [44] C. Reis e Sousa, P. D. Stahl, J. M. Austyn, *J Exp Med* **1993**, 178, 509.
- [45] R. M. Steinman, J. Banchereau, *Nature* **2007**, 449, 419.
- [46] C. G. Figdor, Y. van Kooyk, G. J. Adema, *Nat Rev Immunol* **2002**, 2, 77.
- [47] M. H. Lahoud, F. Ahmet, S. Kitsoulis, S. S. Wan, D. Vremec, C. N. Lee, B. Phipson, W. Shi, G. K. Smyth, A. M. Lew, Y. Kato, S. N. Mueller, G. M. Davey, W. R. Heath, K. Shortman, I. Caminschi, *J Immunol* **2011**, 187, 842.
- [48] K. Shortman, W. R. Heath, *Immunol Rev* **2010**, 234, 18.
- [49] I. Caminschi, E. Maraskovsky, W. R. Heath, *Front Immunol* **2012**, 3, 13.
- [50] K. Hildner, B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, K. M. Murphy, *Science* **2008**, 322, 1097.
- [51] E. J. Sijts, P. M. Kloetzel, *Cell Mol Life Sci* **2011**, 68, 1491.
- [52] E. Segura, J. A. Villadangos, *Traffic* **2011**, 12, 1677.
- [53] M. J. Bevan, *J Exp Med* **1976**, 143, 1283.
- [54] K. L. Rock, L. Shen, *Immunol Rev* **2005**, 207, 166.
- [55] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J Control Release* **2011**, 151, 220.
- [56] S. Burgdorf, A. Kautz, V. Bohnert, P. A. Knolle, C. Kurts, *Science* **2007**, 316, 612.
- [57] A. Mant, F. Chinnery, T. Elliott, A. P. Williams, *Immunology* **2012**, 136, 163.
- [58] M. Cella, A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, A. Lanzavecchia, *Nature* **1997**, 388, 782.
- [59] I. Mellman, R. M. Steinman, *Cell* **2001**, 106, 255.
- [60] G. Grouard, M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, Y. J. Liu, *J Exp Med* **1997**, 185, 1101.
- [61] H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, A. H. Enk, *J Exp Med* **2000**, 192, 1213.
- [62] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig, *J Exp Med* **2001**, 194, 769.
- [63] M. L. Albert, S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, N. Bhardwaj, *J Exp Med* **1998**, 188, 1359.
- [64] C. D. Platt, J. K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R. A. Carano, I. Mellman, L. Delamarre, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 4287.
- [65] E. S. Trombetta, I. Mellman, *Annu Rev Immunol* **2005**, 23, 975.
- [66] M. Hubo, B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettenberg, K. Steinbrink, H. Jonuleit, *Front Immunol* **2013**, 4, 82.
- [67] K. Shortman, M. H. Lahoud, I. Caminschi, *Exp Mol Med* **2009**, 41, 61.
- [68] C. G. Figdor, I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis, C. J. Melief, *Nat Med* **2004**, 10, 475.
- [69] J. J. Moon, B. Huang, D. J. Irvine, *Adv Mater* **2012**, 24, 3724.
- [70] P. J. Tacken, C. G. Figdor, *Semin Immunol* **2011**, 23, 12.
- [71] C. Lee, T. B. Kolesnik, I. Caminschi, A. Chakravorty, W. Carter, W. S. Alexander, J. Jones, G. P. Anderson, S. E. Nicholson, *Clin Exp Allergy* **2009**, 39, 897.
- [72] J. M. Blander, R. Medzhitov, *Nature* **2006**, 440, 808.

- [73] B. N. Hangalapura, D. Oosterhoff, J. de Groot, L. Boon, T. Tuting, A. J. van den Eertwegh, W. R. Gerritsen, V. W. van Beusechem, A. Pereboev, D. T. Curiel, R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, *Cancer Res* **2011**, *71*, 5827.
- [74] P. Daftarian, A. E. Kaifer, W. Li, B. B. Blomberg, D. Frasca, F. Roth, R. Chowdhury, E. A. Berg, J. B. Fishman, H. A. Al Sayegh, P. Blackwelder, L. Inverardi, V. L. Perez, V. Lemmon, P. Serafini, *Cancer Res* **2011**, *71*, 7452.
- [75] M. Kreutz, P. J. Tacken, C. G. Figdor, *Blood* **2013**, *121*, 2836.
- [76] J. Idoyaga, A. Lubkin, C. Fiorese, M. H. Lahoud, I. Caminschi, Y. Huang, A. Rodriguez, B. E. Clausen, C. G. Park, C. Trumpfheller, R. M. Steinman, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 2384.
- [77] D. Dudziak, A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig, *Science* **2007**, *315*, 107.
- [78] C. Petzold, S. Schallenberg, J. N. Stern, K. Kretschmer, *Rev Diabet Stud* **2012**, *9*, 305.
- [79] W. Jiang, W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig, *Nature* **1995**, *375*, 151.
- [80] P. Stahl, P. H. Schlesinger, E. Sigardson, J. S. Rodman, Y. C. Lee, *Cell* **1980**, *19*, 207.
- [81] L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, R. M. Steinman, *J Exp Med* **2002**, *196*, 1627.
- [82] M. D. Witmer-Pack, W. J. Swiggard, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, *Cell Immunol* **1995**, *163*, 157.
- [83] A. J. Meulenbroek, "Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence", *Sanquin*, **2008**.
- [84] S. Rosati, N. J. Thompson, A. J. R. Heck, *Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *48*.
- [85] <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter4.html> (15.11.2014)
- [86] F. Debaene, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorselaer, A. Beck, S. Cianferani, *Anal Chem* **2013**, *85*, 9785.
- [87] O. Rotzschke, K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden, H. G. Rammensee, *Eur J Immunol* **1991**, *21*, 2891.
- [88] R. J. Binder, P. K. Srivastava, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 6128.
- [89] C. J. Melief, S. H. van der Burg, *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 351.
- [90] R. Vermeij, N. Leffers, S. H. van der Burg, C. J. Melief, T. Daemen, H. W. Nijman, *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 702146.
- [91] M. Mueller, E. Schlosser, B. Gander, M. Groettrup, *Int J Cancer* **2011**, *129*, 407.
- [92] S. H. van der Burg, M. S. Bijker, M. J. Welters, R. Offringa, C. J. Melief, *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, *58*, 916.
- [93] B. Jahrsdorfer, G. J. Weiner, *Update Cancer Ther* **2008**, *3*, 27.
- [94] H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, *Nature* **2000**, *408*, 740.
- [95] A. Iwasaki, R. Medzhitov, *Nat Immunol* **2004**, *5*, 987.
- [96] L. Beloeil, M. Tomkowiak, G. Angelov, T. Walzer, P. Dubois, J. Marvel, *J Immunol* **2003**, *171*, 2995.
- [97] A. M. Krieg, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 471.
- [98] C. Bode, G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, D. M. Klinman, *Expert Rev Vaccines* **2011**, *10*, 499.
- [99] M. H. Lahoud, F. Ahmet, J. G. Zhang, S. Meuter, A. N. Policheni, S. Kitsoulis, C. N. Lee, M. O'Keeffe, L. C. Sullivan, A. G. Brooks, R. Berry, J. Rossjohn, J. D. Mintern, J. Vega-Ramos,

- J. A. Villadangos, N. A. Nicola, M. C. Nussenzweig, K. J. Stacey, K. Shortman, W. R. Heath, I. Caminschi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 16270.
- [100] D. A. Brown, S. H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M. I. Nerenberg, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 26801.
- [101] D. Yu, Q. Zhao, E. R. Kandimalla, S. Agrawal, *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 2585.
- [102] E. R. Kandimalla, L. Bhagat, D. Yu, Y. Cong, J. Tang, S. Agrawal, *Bioconjug Chem* **2002**, *13*, 966.
- [103] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromol Rapid Commun* **2012**, *33*, 1613.
- [104] H. Schlaad, C. Diehl, A. Gress, M. Meyer, A. L. Demirel, Y. Nur, A. Bertin, *Macromol Rapid Commun* **2010**, *31*, 511.
- [105] T. von Erlach, S. Zwicker, B. Pidhatika, R. Konradi, M. Textor, H. Hall, T. Luhmann, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5291.
- [106] R. Konradi, B. Pidhatika, A. Muhlebach, M. Textor, *Langmuir* **2008**, *24*, 613.
- [107] S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, T. M. Allen, *J Pharm Sci* **1996**, *85*, 133.
- [108] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler, *J Control Release* **2007**, *119*, 291.
- [109] B. Pidhatika, J. Moller, E. M. Benetti, R. Konradi, E. Rakhmatullina, A. Muhlebach, R. Zimmermann, C. Werner, V. Vogel, M. Textor, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9462.
- [110] N. Zhang, T. Pompe, I. Amin, R. Luxenhofer, C. Werner, R. Jordan, *Macromol Biosci* **2012**, *12*, 926.
- [111] K. Kempe, A. Vollrath, H. W. Schaefer, T. G. Poehlmann, C. Biskup, R. Hoogenboom, S. Hornig, U. S. Schubert, *Macromol Rapid Commun* **2010**, *31*, 1869.
- [112] R. Luxenhofer, G. Sahay, A. Schulz, D. Alakhova, T. K. Bronich, R. Jordan, A. V. Kabanov, *J Control Release* **2011**, *153*, 73.
- [113] R. Donev, N. Koseva, P. Petrov, A. Kowalczyk, J. Thome, *World J Biol Psychiatry* **2011**, *12 Suppl 1*, 44.
- [114] J. Bühler, "Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-oxazolin)bürsten als Nanocarrier für Drug Delivery Systeme", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2013**.
- [115] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E. M. Lima, D. E. Discher, *Pharm Res* **2007**, *24*, 2099.
- [116] J. A. Champion, S. Mitragotri, *Pharm Res* **2009**, *26*, 244.
- [117] Y. M. Chen, *Macromolecules* **2012**, *45*, 2619.
- [118] H. Meier, B.Z., "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", Thieme Verlag Stuttgart.
- [119] Adam, Läger, Stark, "Physikalische Chemie und Biophysik", Springer Verlag, Berlin, **2009**.
- [120] K. Munk, "Taschenlehrbuch Biochemie Zellbiologie", Thieme Verlag Stuttgart.
- [121] W. Schaertl, "*Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [122] F. Gröhn, "Characterization of Polymers, Colloids and Nanostructures", **2009**.
- [123] M. Schmidt, "Simultaneous static and dynamic light scattering: application to polymer structure analysis", in *Dyanmic Light Scattering, The Method and Some Applications*, Oxford Science Publications, **1993**, p. 372.
- [124] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, "*Makromolekulare Chemie* ", 3. überarbeitete und erweiterte Ausgabe ed. edition, Birkhäuser, Basel.
- [125] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken, "Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen", Springer Spektrum, **2014**.
- [126] F. Petzke, "Skriptum zum Praktikum über optische Molekülspektroskopie".

- [127] J. L. Clark, P. F. Miller, G. Rumbles, *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 4428.
- [128] <http://www.ibs.fr/IMG/png/jablsmall-2.png>. (02.12.2014)
- [129] J. R. Lakowicz, "Principle of Fluorescence Spectroscopy", Springer, New York, **2006**.
- [130] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1.
- [131] P. Schwille, E. Hauenstein, "Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications".
- [132] P. Schwille, F. J. MeyerAlmes, R. Rigler, *Biophysical Journal* **1997**, *72*, 1878.
- [133] D. Schäffel, "Dissertation", Max-Planck-Institut für Polymerforschung, **2014**.
- [134] F. Lottspeich, J. W. Engels, "Bioanalytik, 2.Auflage", Elsevier München, **2006**.
- [135] M. Minsky, *Scanning* **1988**, *10*, 128.
- [136] [http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3\\_fluoreszenz/clsm/1\\_einleitung.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm) (02.12.2014)
- [137] U. Sack, A. Tamok, G. Rothe, "Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie", Karger, Basel, **2007**, pp 27- 70.
- [138] <http://www.selectscience.net/images/flow-cytometer-schematic.jpg> (02.12.2014)
- [139] H. Liu, A. P. Johnston, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 5744.
- [140] L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1526.
- [141] J. Ramos, J. Forcada, R. Hidalgo-Alvarez, *Chem Rev* **2013**, *114*, 367.
- [142] M. H. Smith, L. A. Lyon, *Acc Chem Res* **2011**, *45*, 985.
- [143] L. Nuhn, M. Hirsch, B. Krieg, K. Koynov, K. Fischer, M. Schmidt, M. Helm, R. Zentel, *ACS Nano* **2014**, *6*, 2198.
- [144] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2836.
- [145] M. Schmidt, " *Dynamic Light Scattering, The Method and Some Applications*", Clarendon Press, Oxford. Brown, W., **1993**.
- [146] Y. Jin, G. Luo, T. Oka, T. Manabe, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3385.
- [147] L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailander, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4111.
- [148] J. Buhler, S. Gietzen, A. Reuter, C. Kappel, K. Fischer, S. Decker, D. Schaffel, K. Koynov, M. Bros, I. Tubbe, S. Grabbe, M. Schmidt, *Chemistry* **2014**, *20*, 12405.
- [149] K. Rausch, "Diplomarbeit ", Johannes-Gutenberg Universität Mainz, **2010**.
- [150] S. Lindegren, H. Andersson, L. Jacobsson, T. Back, G. Skarnemark, B. Karlsson, *Bioconjug Chem* **2002**, *13*, 502.
- [151] M. Sahl, "Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Bürsten mit Polypeptidseitenketten", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- [152] D. Weller, "Synthese und Charakterisierung von Polymeren mit peptidischen Seitenketten", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2013**.
- [153] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 6288.
- [154] M. Hemmelmann, K. Mohr, K. Fischer, R. Zentel, M. Schmidt, *Mol Pharm* **2013**, *10*, 3769.
- [155] S. Abé, "Synthese und Charakterisierung von polymerbasierten Trägersystemen für biomedizinische Anwendungen", in Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2014**.
- [156] J. Buhler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromol Rapid Commun* **2013**, *34*, 588.
- [157] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc Chem Res* **2011**, *44*, 666.
- [158] A. Carré, V. Lacarrière, "Relationship between cell adhesion and protein adsorption", Avon, Frankreich.
- [159] <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp00143.pdf> (13.11.2014)

- [160] G. Parmiani, M. T. Lotze, "*Tumor Immunology*", Taylor & Francis Ltd. , **2002**.
- [161] K. Mahnke, M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, R. M. Steinman, *J Cell Biol* **2000**, *151*, 673.
- [162] R. Maldonado-Lopez, T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, M. Moser, *J Exp Med* **1999**, *189*, 587.
- [163] M. A. West, R. P. Wallin, S. P. Matthews, H. G. Svensson, R. Zaru, H. G. Ljunggren, A. R. Prescott, C. Watts, *Science* **2004**, *305*, 1153.
- [164] W. S. Garrett, L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan, I. Mellman, *Cell* **2000**, *102*, 325.
- [165] J. D. Mintern, C. Percival, M. M. Kamphuis, W. J. Chin, F. Caruso, A. P. Johnston, *Adv Healthc Mater* **2013**, *2*, 940.
- [166] J. L. Pooley, W. R. Heath, K. Shortman, *J Immunol* **2001**, *166*, 5327.
- [167] K. Birkholz, M. Schwenkert, C. Kellner, S. Gross, G. Fey, B. Schuler-Thurner, G. Schuler, N. Schaft, J. Dorrie, *Blood* **2010**, *116*, 2277.
- [168] I. Caminschi, M. H. Lahoud, K. Shortman, *Eur J Immunol* **2009**, *39*, 931.
- [169] B. Chatterjee, A. Smed-Sorensen, L. Cohn, C. Chalouni, R. Vandlen, B. C. Lee, J. Widger, T. Keler, L. Delamarre, I. Mellman, *Blood* **2012**, *120*, **2011**.
- [170] Q. Zhao, S. Matson, C. J. Herrera, E. Fisher, H. Yu, A. M. Krieg, *Antisense Res Dev* **1993**, *3*, 53.
- [171] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Nat Immunol* **2009**, *10*, 1237.
- [172] T. G. Berger, E. S. Schultz, *Curr Top Microbiol Immunol* **2003**, *276*, 163.
- [173] J. Banchereau, R. M. Steinman, *Nature* **1998**, *392*, 245.
- [174] L. J. Cruz, R. A. Rosalia, J. W. Kleinovink, F. Rueda, C. W. Lowik, F. Ossendorp, *J Control Release* **2014**, *192*, 209.
- [175] D. Raghuwanshi, V. Mishra, M. R. Suresh, K. Kaur, *Vaccine* **2012**, *30*, 7292.
- [176] S. Burgdorf, C. Kurts, *Curr Opin Immunol* **2008**, *20*, 89.
- [177] D. Weller, A. Medina-Oliva, H. Claus, S. Gietzen, K. Mohr, A. Reuter, D. Schäffel, S. Schöttler, K. Koynov, M. Bros, S. Grabbe, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecules* **2013**, *46*, 8519.

## Danksagung