

Interaktion von Nanopartikeln mit immortalisierten Zelllinien und Stammzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät der Naturwissenschaften

der Universität Ulm



ulm university universität
uulm

Vorgelegt von

Steffen Lorenz

aus Neustadt a. d. Aisch

Ulm im Jahr 2010

Diese Arbeit wurde angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung



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



Organische Chemie III / Max-Planck-Institut für Polymerforschung

Dissertation

Interaktion von Nanopartikeln mit immortalisierten Zelllinien und Stammzellen

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

Fakultät der Naturwissenschaften der Universität Ulm

Steffen Lorenz

Amtierender Dekan: Herr Prof. Dr. Axel Groß

Gutachter/innen:

1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Katharina Landfester
2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. Tanja Weil
3. Gutachter/in: Herr PD Dr. med. Volker Mailänder

Datum der Einreichung: 22.11.2010

Datum der Promotion: 02.03.2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	viii
2	Einleitung und Motivation	1
3	Theorie.....	4
3.1	Herstellung von Polymer-Nanopartikeln und Nanokapseln	4
3.2	Einfluss der Polymer-Nanopartikel-Beschaffenheit auf die Zellaufnahme	8
3.3	Nanopartikel als Transport-Systeme	10
3.4	Anwendung von Nanopartikeln für Mesenchymalen Stammzellen	11
3.5	Bioaktive multifunktionale Beschichtungen für humanmedizinische Hartgewebeimplantate	13
4	Methoden	19
4.1	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM) ...	19
4.2	Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskop	21
4.3	Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	22
4.4	Rasterelektronenmikroskop (REM)	24
4.5	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter: FACS)	25
4.6	Fluoreszenz- Microtiterplatten-Leser.....	27
4.7	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	28
5	Material und Durchführung	30
5.1	Material	30
5.1.1	Geräte	30
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
5.1.3	Reagenzien.....	32
5.1.4	Zelllinien.....	34
5.1.5	Oligonukleotide	35
5.2	Durchführung	36
5.2.1	Zellkultur	36
5.2.2	Fluorescence Activated Cell Sorter.....	37
5.2.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	39
5.2.4	Stimulated-Emission-Depletion-Mikroskopie.....	40
5.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie.....	40
5.2.6	Rasterelektronenmikroskopie	41
5.2.7	Toxizitätstests	42
5.2.8	Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Messungen.....	42
6	Ergebnisse und Diskussion	43

6.1 Einfluss des Polymers und des Tensids auf die Aufnahme in Zellen ^[147]	43
6.1.1 Toxizität der Tenside SDS und Lutensol [®]	45
6.1.2 Zytotoxizität der PMA-Partikel im FACS	46
6.1.3 Partikelaufnahme im FACS	48
6.1.4 Untersuchung der Partikelaufnahme im CLSM	52
6.1.5 Toxizität und Aufnahme von Detran-Methacrylat-Polymer-Partikeln	54
6.2 Aufnahme von DNA-gefüllten PBCA-Kapseln in Zellen und Freisetzung in Zellen ^[58, 153]	56
6.2.1 Überprüfen der Dichtigkeit der Kapseln	57
6.2.2 Kapselaufnahme in Zellen gemessen im FACS	58
6.2.3 Zytotoxizitätsbestimmung der Kapseln im FACS	59
6.2.4 Untersuchungen zur Kapselaufnahme in Zellen im CLSM	60
6.2.5 Kapselaufnahme in Zellen (TEM)	67
6.2.6 Kolokalisation von CY5-Oligonukleotiden in der Zelle untersucht im CLSM	68
6.3 Funktionalisierung von Titanoberflächen mit Nanopartikeln für Hartgewebeimplantate	74
6.3.1 Aufnahme und Toxizitätsstudien mit phosphonat-funktionalisierten Polystyrol- Nanopartikeln	78
6.3.2 Differenzierungsstudien mit Phosphonat-funktionalisierten Polystyrol- Nanopartikeln in MSC ^[166]	81
6.3.3 Hydroxylapatit-funktionalisierte VBPS-Partikel und ihre Interaktion mit MSC	90
6.3.4 Funktionalisierung von Titanoberflächen mit VPBS-Nanopartikeln und das resultierende Anhaften und Wachstum von MSC	92
6.3.5 Aufnahme von Zytotoxizität von Wirkstofftragenden Nano-Kapseln und Partikeln	98
6.4 Etablierung neuer Methoden zum Studium der Partikelaufnahme in Zellen	104
6.4.1 Zellzyklusabhängige Aufnahme von Partikeln	104
6.4.2 Analyse der Partikelaufnahme lebender Zellen im STED	105
7 Zusammenfassung und Ausblick	109
8 Summary and Outlook	112
9 Literaturverzeichnis	114
10 Danksagung	126
11 Lebenslauf	128
12 Publikationen	129
13 Eidesstattliche Erklärung	131

1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin-D
BMA	Butylmethacrylat
BMP	Knochen Morphogenetisches Protein (Bone Morphogenetic Protein)
cHMA	Cyclohexylmethacrylat
CLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy)
CTMA-Cl	Cetyltrimethylammoniumchlorid
DMAP	Di-methyl-amino-pentan
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	fluoreszenz-aktiver Zellsorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FGF-2	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (Fibroblast growth factor 2)
FSC	Vorwärtsstreuung (Forward scatter)
HD	Hexandiol
LMA	Lauryl Methacrylat
MMA	Methylmethacrylat
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell)
nFL1	normalisierte Fluoreszenzintensität (Kanal 1)
NK	Negativkontrolle
PBCA	Polybutylcyanoacrylat (poly(n-butylcyanoacrylate))
PLA	Poly-Laktid
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Propylmethacrylat
PMI	Perylenmonoimid
REM	Rasterelektronenmikroskop (SEM: Scanning Electron Microscope)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMA	Stearylmetacrylat
SSC	Seitwärtsstreuung (Sideward scatter)
STED	Stimulated Emission Depletion
^t BMA	Tertbutylmethacrylat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (Transmission Electron Microscopy)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (Transforming growth factor β)
VBPS	Venyl-Benzyl-Phosphonsäure
VPS	Venyl-Phosphonsäure

2 Einleitung und Motivation

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Partikeln im Nanometerbereich. Das Wort „Nano“ kommt aus dem Griechischen von dem Wort *Nános* (νάνος), was Zwerg bedeutet. Die Größe der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel beträgt etwa 200 nm. Das ist der 350.-Teil des Durchmessers eines menschlichen Haars (ca. 70 μm). Nanopartikel sind nicht eine Erfindung der Menschen, es gibt sie bereits seit der Entstehung der Erde. Anorganische Nanopartikel z.B. aus Christobalit entstanden bei Vulkanausbrüchen in Form kleinster Staubteilchen, die sich über die Atmosphäre weit und schnell verteilten^[1-3]. Nach der Entstehung von Pflanzen kamen weitere Nanopartikel hinzu, die organischen. Sie bestehen aus wenigen Nanometern kleinen Huminstoffen, den Abbauprodukten von zum Beispiel Blättern und Gras^[4-5]. An deren Herstellung sind unter anderem Bakterien beteiligt. Bakterien entwickelten auch eine Art von Nanopartikeln, die ihnen eine magnetisch gerichtete Orientierung ermöglichen. Magnetotaktische Bakterien wie z.B. der Art *Magnetospirillum magnetotacticum* bilden dazu Magnetosomen aus Magnetit ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_4$) oder Greigit ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}_4$) aus, die von einer Monoschicht aus Phospholipiden, Proteinen und Glykoproteinen umgeben sind^[6]. Auch Viren entwickelten sich als eine Form von Nanopartikel. Die kleinsten besitzen eine Größe von nur 15 nm (*Circoviridae* mit ca. 15 nm Durchmesser^[7]; Poliovirus, ca. 30 nm Durchmesser^[8]), während die größten einen Durchmesser von über 400 nm besitzen (Pockenviren (*Poxviridae*)^[9]; Mimivirus (*Mimiviridae*)^[10]). Genau betrachtet handelt es sich bei Viren um Nanokapseln, in denen Nukleinsäuren und Proteine in einer Protein-(Lipid)-schale (Kapsid) verkapselt sind, die z.T. funktionalisiert ist^[11-12]. Sie weisen eine effiziente Aufnahme in Zellen auf, die zum Teil auf hoch spezifische Aufnahmeprozessen beruhen^[13-14]. Auch sind Viren keine echte Lebensform, da ihre Reproduktion abhängig ist von den Reproduktionsmechanismen der Wirtszelle^[15-16].

Aber auch Menschen haben schon seit langer Zeit Nanopartikel erzeugt und genutzt, ohne zu wissen, dass es sich dabei um Nanopartikel handelt. So entstehen bei der Verbrennung von organischem Material Nanopartikel in Form von Ruß^[17-18]. Dieser wurde z.B. als Farbstoff

verwendet, um auf diese Weise Haut oder Gegenstände zu bemalen^[19]. Vor allem Ruß und Feinstaub stellt heute besonders bei älteren Dieselfahrzeugen und anderen Verbrennungsprozessen ein großes Problem für die Gesundheit dar. Bereits zur Zeit des römischen Reichs verwendete man unwissend Gold-Nanopartikel in der Glasproduktion. Bei der thermischen Behandlung von Glas und Gold entstehen Gold-Nanopartikel in Clustern mit einer Größe von 10-20 nm, die eine Rotfärbung des Glases hervorrufen. Dies ist bedingt durch eine ins Rote verschobene Plasmonenschwingung durch die Gold-Nanopartikel^[20]. Die Römer benutzten auch als erste Menschen Beton. Die in ihm enthaltenen wenige Nanometer großen Kristallstrukturen verleihen ihm seine hohe Festigkeit. Damit war es möglich, riesige Kuppeln mit 43 m Durchmesser zu bauen, wie im Pantheon, das bis heute erhalten ist. Die erste industrielle Nutzung von Nanopartikeln war ebenfalls Beton und geht auf das 19. Jahrhundert zurück.

Auch in der kosmetischen Industrie finden sich mittlerweile zahlreiche Produkte, die Nanopartikel enthalten. Sonnencreme enthält TiO_2 -Nanopartikel, die als „Lichtstreuer“ verhindern, dass zu viel schädliche UV-Strahlung in die Haut eindringen kann^[21]. Zahnpasten enthalten neben den Nanopartikeln, wie Titandioxid (TiO_2) und Aluminiumoxid (Al_2O_3) zur Verbesserung der Reinigung (Scheuereffekt)^[22-23], z.T. mittlerweile Hydroxylapatit-Nanopartikel zur Reparatur von Mikrorissen im Zahnschmelz (z.B. Zahncreme BioRepair[®]^[24-25]). Selbst die Lebensmittelindustrie verwendet Nanopartikel. Siliziumoxid-Nanopartikel werden z.B. als Verdickungsmittel im Tomaten-Ketchup verwendet oder Antikoagulantien im Speisesalz, Titandioxid dient zum Teil zur Aufhellung von Salatdressings und Aluminiumsilikat-Nanopartikel sollen der Verklumpung pulverförmiger Lebensmittel entgegenwirken^[26]. Weltweit, so vermutet die Umweltschutzorganisation BUND, sind 2008 bereits 600 Lebensmittel mit Nanozusätzen auf dem Markt. Es fehlen bisher Studien über den Verbleib und die Auswirkungen dieser Partikel im zellulären System, so dass immer wieder Zweifel über die Unbedenklichkeit dieser Nanopartikel aufkommen^[27-28].

Auch die Medizin setzt seit längerer Zeit Nanopartikel ein. So werden als Kontrastmittel bei der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) Magnetit-Nanopartikel^[29-32] zur kontrastreicheren Bildgebung von Geweben verabreicht. Die Partikel sind abbaubar und die

Abbauprodukte werden nach einiger Zeit wieder aus dem Körper ausgeschleust^[33-34]. Ähnliche Partikel werden für die Hyperthermiebehandlung bei Krebs im MRT eingesetzt^[35-36]. Die Partikel werden in den Bereich des Tumors verabreicht und durch das Magnetfeld des MRT erhitzt. Diese Hyperthermie führt schließlich zum Absterben der Zellen in diesem Bereich und somit zur Zerstörung des Tumors. Des Weiteren werden Nanopartikel und Nanokapseln neben ihrer Funktion als Marker von Zellen, insbesondere von Stammzellen^[37-38], zunehmend bedeutender als Lieferanten von Wirkstoffen, wie Medikamenten^[39-40] oder Chemotherapeutika^[41-42].

Die Bedeutung von Nanopartikeln in der heutigen Zeit wird auf vielen Gebieten immer wichtiger. Bisher sind immer noch viele Grundlagen der Nanopartikel-Zellinteraktion unklar. Besonders die Beeinflussung von Zellen und des Organismus durch Nanopartikel ist noch nicht genau erforscht. Dabei spielt neben dem verwendeten Polymer die Funktionalisierung der Nanopartikel eine entscheidende Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die Einflüsse verschiedener Nanopartikel/Nanokapseln und deren Polymeren und Funktionalisierung auf die Zellaufnahme und deren Verträglichkeit im biologischen System auch über längere Zeit näher zu untersuchen. Zum anderen wurde eine konkrete Anwendung der Nanopartikel und Nanokapseln zur Funktionalisierung von Oberflächen für Titanimplantate und zur Freisetzung von pharmakologischen Substanzen mit Zellen getestet und charakterisiert.

3 Theorie

In diesem Teil wird der theoretische Hintergrund zu dieser Arbeit näher erklärt. Dabei wird neben den biologischen Gesichtspunkten auf die chemische Synthese der verwendeten Nanopartikel/Nanokapseln näher eingegangen, die zwar nicht persönlich durchgeführt wurde, zum Verständnis der Arbeit aber nötig ist.

3.1 Herstellung von Polymer-Nanopartikeln und Nanokapseln

Zur Herstellung von Nanopartikeln gibt es heute zahlreiche verschiedene Methoden. Neben der Suspensionspolymerisation^[43-44] und der Emulsionspolymerisation^[45] ist die Miniemulsionspolymerisation^[46-47] für diese Arbeit am bedeutendsten, da die verwendeten Nanopartikel mit diesem Verfahren hergestellt wurden.

Bei der Miniemulsionspolymerisation wird ein System mit zwei nicht mischbaren Phasen verwendet (Abbildung 1). In der ersten Phase befindet sich das Monomer, der Initiator und evtl. (Farb-)Stoffe, die einpolymerisiert werden sollen, gelöst. In der zweiten Phase ist ein Tensid enthalten, das zur Stabilisierung der Partikel dienen wird. Die Menge und Art an verwendeten Tensid bedingt die Größe der entstehenden Nanopartikel. Um kleinere Partikel zu erhalten, wird mehr Tensid eingesetzt. Das System wird zunächst gerührt und anschließend starken Scherkräften ausgesetzt, z.B. Ultraschall. Dies führt dazu, dass kleinste Nanotröpfchen aus der Phase 1 in der Phase 2 entstehen. Diese sind durch das Tensid aus Phase 2 stabilisiert. Auch die Länge der Ultraschallbehandlung kann zur Einstellung der Partikelgröße dienen. Je länger sie andauert, desto kleinere Partikel entstehen. Anschließend können das Monomer und der Initiator in den Tröpfchen zur Reaktion gebracht werden und es entstehen Nanopartikel ohne Veränderung der Größe^[47].

Partikel aus Polystyrol, hergestellt mit Hilfe der Miniemulsion, zeichnen sich durch eine hohe Monodispersität, enge Größenverteilung und sehr lange Stabilität bei einer leicht einzustellende Partikelgröße aus^[48-50]. Da sie im zellulären System nicht abbaubar und toxisch sind und eine sehr gute Stabilität besitzen, eignen sie sich hervorragend als Modellpartikel für zelluläre Beobachtungen auch über längere Zeiträume. Polystyrollatices sind leicht über

Copolymerisation zu funktionalisieren wie mit den bereits bekannten Funktionalisierungen durch Carboxyl- und Aminogruppen^[50]. Es ist möglich, komplexe Monomergemische einzusetzen und auf diese Weise nicht nur die Polymereigenschaft, sondern auch die Oberflächenstruktur der resultierenden Nanopartikel durch Anbindung funktioneller Gruppen zu variieren. Oberflächengruppen mit unterschiedlicher Ladung und Größe können so auf dem Partikel kovalent gebunden werden. Dies wiederum ermöglicht es, die Aufnahme der Partikel in Zellen zu beeinflussen^[50-51]. Des Weiteren können neben der radikalischen Polymerisation auch anionische Polymerisation und Polyaddition in Miniemulsion durchgeführt werden (PBCA, Polyurethane, Polyester, usw.).

In dieser Arbeit wurden erstmals Polystyrolnanopartikel eingesetzt, die eine Funktionalisierung mit Phosphonatgruppen tragen. Diese Partikel wurden von Anke Zeller im Rahmen ihrer Doktorarbeit synthetisiert^[52]. Dazu wurde Wasser und das nicht ionische Tensid Lutensol® AT50 (siehe auch Tabelle 1), sowie das Comonomer Vinylphosphonsäure in der kontinuierlichen Phase eingesetzt. In der dispersen Phase wurde das Monomer Styrol mit dem Hydrophob Hexadecan und dem hydrophoben Initiator V59 (2,20-Azobis(2,4-dimethylbutyronitril)) eingesetzt. Außerdem wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Perylenmonoimid (PMI) hinzugefügt, damit die Nanopartikel über Fluoreszenz detektiert werden können.

In dieser Arbeit werden verschiedene Polymernanopartikel mit verschiedenen Funktionalisierungen verwendet. In den folgenden Abschnitten, werden diese näher vorgestellt zu Beginn eines Kapitels und der Grund für deren Verwendung erläutert.

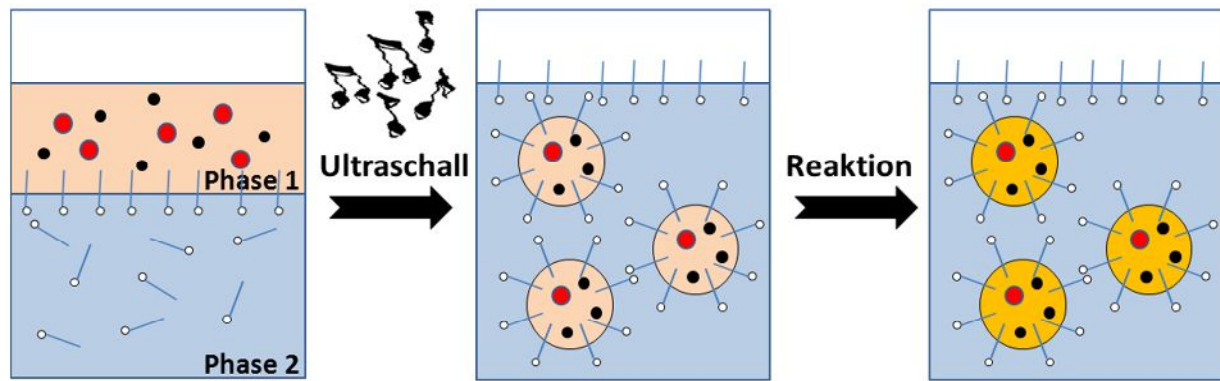


Abbildung 1: Schema einer Miniemulsionspolymerisation. Zwei nicht mischbare Phasen (hier Phase 1 und Phase 2) werden durch Ultraschall hohen Scherkräften ausgesetzt. Es entstehen dabei kleine Nanotröpfchen, die durch ein Tensid stabilisiert sind. Anschließend können die Initiatoren und Monomere im Inneren der Tröpfchen zur Reaktion gebracht werden, und es entstehen die Polymerpartikel. Diese können außerdem Farb- oder Wirkstoffe oder andere Substanzen enthalten.

Auch Nanokapseln wurden in dieser Arbeit verwendet. Sie bieten durch Ihre Eigenschaften andere Möglichkeiten als kompakte Partikel. Zum einen ist es möglich, die Menge an eingesetztem Polymer weit geringer zu halten, da das Polymer lediglich zur Bildung einer dünnen Kapselhülle benötigt wird. Zum anderen ist es möglich, in Kapseln auch hydrophile Stoffe einzuschließen. Da eine Vielzahl zelluläre Wirkstoffe immer in wässriger Form vorliegen müssen, bringen Nanokapseln einen großen Vorteil, wenn es darum geht, Wirkstoffe in die Zelle einzubringen. Eine Freisetzung aus den Kapseln ist durch die Verwendung abbaubarer Polymere, wie z.B. Stärke oder Polybutylcyanoacrylat (PBCA), möglich.

Die Herstellung von Kapseln kann durch verschiedene Verfahren erfolgen und ist letztlich durch das zu verwendende Monomer bestimmt, da unterschiedliche Polymere durch unterschiedliche Verfahren hergestellt werden. Zur Verkapselung von Peptiden, Proteinen oder DNA/RNA lassen sich verschiedene Verfahren verwenden: Die Nanofällung^[53], die Kapselherstellung mittels Grenzflächenpolymerisation z.B. mit Polyaddition^[54] oder anionischer Polymerisation^[55-56] sind mögliche Herstellungsverfahren.

In dieser Arbeit wurden PBCA-Kapseln verwendet, die anionisch mittels inverser Miniemulsion hergestellt wurden. Diese wurden von Grit Baier in ihrer Doktorarbeit aufgrund der überwiegend positiven Eigenschaften des PBCA-Polymers *in vitro* und *in vivo* (siehe auch 3.2) hergestellt. Bereits früher wurde DNA in Nanotröpfchen gebracht und in diesen PCR

durchgeführt^[57]. Grit Baier ist es in der Doktorarbeit erstmals gelungen, DNA in einer PBCA-Hülle zu verkapseln^[58]. Für die Synthese dieser PBCA-Kapseln wurde die anionische Polymerisation^[55-56] verwendet. Dazu wird zunächst eine Wasser-in-Öl-Miniemulsion hergestellt. Im Wasser (disperse Phase) gelöst ist die DNA, die in der Ölphase (kontinuierliche Phase), aus Migliol, miniemulgiert wird. Die Stabilisierung erfolgt mittels Span[®]80 und Tween[®]80. Die anionische Polymerisation erfolgt schließlich nach Zugabe von Butylcyanacrylat (BCA) gemischt mit Chloroform. Anschließend erfolgt die Aufreinigung mit Hilfe von Ethanol, um die Kapseln von der Ölphase zu befreien. Die Kapseln lassen sich durch die Stabilisierung eines Tensids (SDS, Lutensol[®] AT50 oder CTMA-CI) in Wasser überführen.

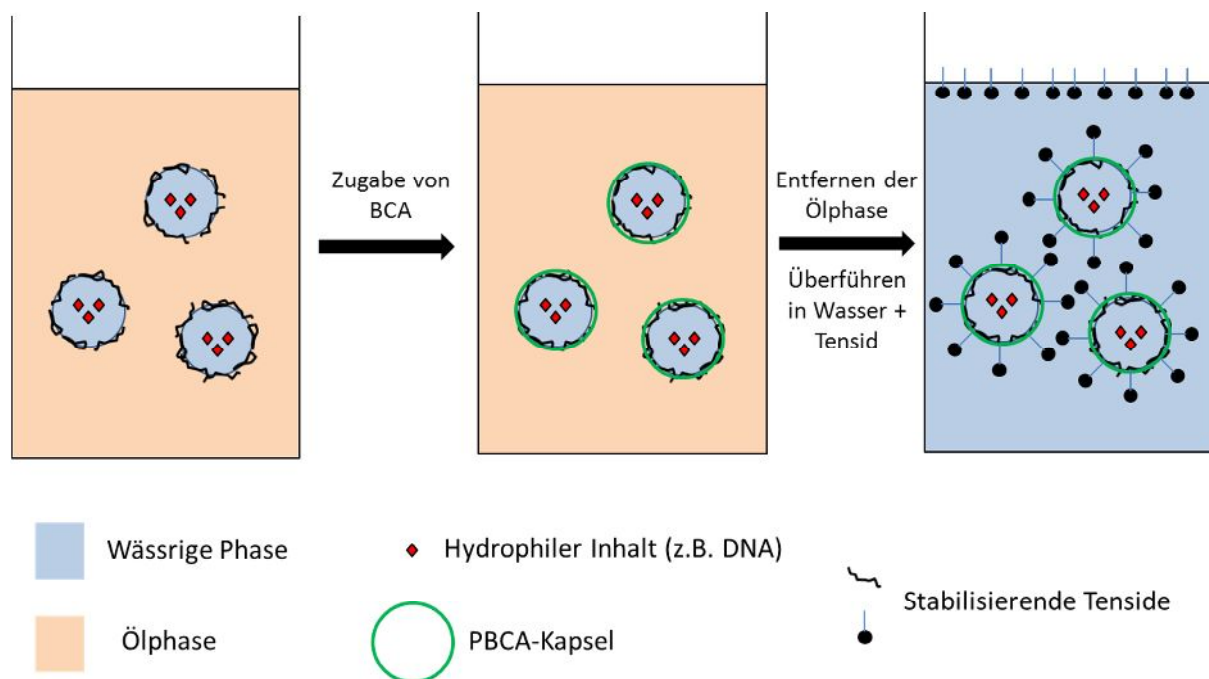


Abbildung 2: Die anionische Grenzflächenpolymerisation erfolgt in inverser Miniemulsion mit hydrophilen Komponenten innerhalb von wässrigen Tröpfchen, während die kontinuierliche Phase aus einem Öl besteht. Die wässrigen Tröpfchen sind durch ein Tensid stabilisiert. Anschließend wird das in Chloroform gelöste Butylcyanacrylat (BCA) zugegeben, dessen Polymerisation an der Grenzfläche durch das OH⁻ des Wassers initiiert wird. Das entstehende Polymer bildet die Kapselhülle. Anschließend kann das Öl entfernt werden und die Kapseln können in Wasser und ein stabilisierendes Tensid überführt werden.

Mit diesen PBCA-Kapseln ist es möglich, DNA oder RNA in Zellen einzuschleusen und freizusetzen. Verkapselte DNA wurde in Mikrokapseln bereits gezeigt^[59], allerdings waren diese Kapseln 100 µm groß und deshalb wenig für die Zellaufnahme geeignet. Die Verwendung von Nanokapseln aus dem Polymer PBCA eröffnet neue Möglichkeiten, die in der vorliegenden Doktorarbeit *in vitro* im Hinblick auf eine spätere Anwendung (auch *in vivo*) näher untersucht werden.

3.2 Einfluss der Polymer-Nanopartikel-Beschaffenheit auf die Zellaufnahme

Die Art und Qualität der Aufnahme von Polymer-Nanopartikeln in Zellen ist sehr von der Beschaffenheit der Partikel abhängig. Dabei spielt nicht nur die Art des Polymers eine Rolle^[60-62], sondern auch evtl. Oberflächenfunktionalisierungen^[51, 63-65] und die bei der Synthese verwendeten Tenside^[66]. Bisher wurden einige Polymere bezüglich der zellulären Aufnahme systematisch untersucht, wie PBCA^[62], Polyisopren^[60] und Poly(L-lactide) (PLLA), Poly[(D,L-lactide)-co-glycolide] 50:50 (PLGA) und Poly(ε-caprolactone) (PCL)^[61]. Eine Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Methacrylate mit unterschiedlicher Alkylseitenkette auf die Zellaufnahme wurde aber bisher nie untersucht.

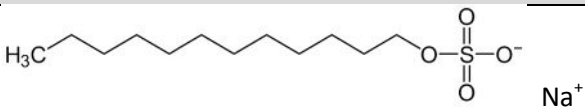
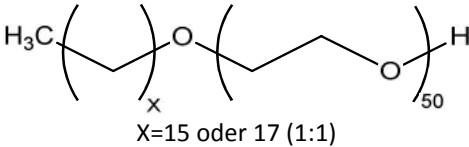
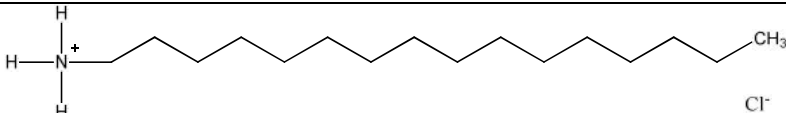
Die Art des Polymers bestimmt viele Eigenschaften des Partikels, z.B. die physikalischen Eigenschaften, wie den Glaspunkt, die Hydrophobizität oder die Struktur der Partikeloberfläche. Dies sind wichtige Faktoren, die eine Zellinteraktion beeinflussen können. Während der Glaspunkt und damit die Weichheit des Partikels bei physiologischen Bedingungen je nach Polymer variiert, ist die Hydrophobizität der Partikeloberfläche entscheidend für die Interaktion mit Proteinen^[67]. Durch eine höhere Hydrophobizität wird mehr Protein auf der Partikeloberfläche adsorbiert^[67]. Entsteht eine dichtere Proteinhülle um die Partikel, ändert sich dadurch auch das Erscheinungsbild des Partikels für die Zelle. Zu dem Einfluss des Glaspunkts des Polymers des Partikels auf die zelluläre Aufnahme gibt es bisher keine Untersuchungen. Dieser Einfluss wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

Oberflächenfunktionalisierungen der Partikel bieten die Möglichkeit, die Oberfläche der Partikel gezielt zu verändern. Durch einbringen geladener Oberflächengruppen lässt sich auch die Hydrophobizität der Oberfläche verringern. Es ist möglich sowohl positive, als auch negative Gruppen auf die Oberfläche der Partikel zu bringen. Unterschiedlich geladene Gruppen auf der Partikeloberfläche zeigten bereits in früheren Studien eine unterschiedlich gute Aufnahme in Zellen^[51]. So wurden Partikel mit Aminogruppen-Funktionalisierung wesentlich besser in Zellen aufgenommen^[68]. Aber auch Carboxylgruppen-funktionalisierte Nanopartikel werden zum Beispiel von HeLa-Zellen sehr gut aufgenommen^[31].

Durch Tenside lässt sich die Eigenschaft der Partikeloberfläche ebenfalls modifizieren. Bei der

Herstellung der Partikel für diese Arbeit wurden drei verschiedene Tenside zur Stabilisierung eingesetzt: Natriumdodecylsulfat (kurz: SDS), Lutensol® AT50 und Cetyltrimethylammoniumchlorid (kurz: CTMA-Cl) (siehe Tabelle 1). Über die Verwendung dieser unterschiedlich geladenen Tenside ist es möglich, die Oberflächenladung der Partikel zu steuern. Eine unterschiedliche Ladung der Partikel bewirkt eine unterschiedliche Aufnahme in Zellen^[51]. Die ionischen Tenside SDS (negativ geladen) und CTMA-Cl (positiv geladen) führen auch durch ihre Ladung zu einer verbesserten Aufnahme der Partikel ins Zellinnere, während das nichtionische Lutensol® AT50 das Aufnahmeverhalten nicht verbessert, bzw. reduziert. Da Tenside aber ähnlich wie die Lipide der Zellmembran beschaffen sind, können sie mit dieser interagieren. Allerdings kann der Einbau von Tensid, insbesondere von freiem, nicht partikulär gebundenem Tensid in der Nanopartikellösung zur Veränderung oder sogar Zerstörung der Zellmembran führen^[69]. Deshalb wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel besonders darauf geachtet, ob von den verwendeten Partikelsuspensionen ein zelltoxischer Effekt hervorgerufen wird. Insbesondere das Tensid CTMA-Cl zeigte in der Vergangenheit immer wieder eine hohe Toxizität auf die Zellen. Gerade deshalb wurde stets eine gründliche Dialyse der Polymerdispersionen durchgeführt, um freies Tensid so weit wie möglich zu reduzieren.

Tabelle 1: Übersicht über die stabilisierenden Tenside der verwendeten Nanopartikel.

Name des Tensids	Art des Tensids	Strukturformel
SDS	anionisch	
Lutensol® AT 50	nicht ionisch	
CTMA-Cl	kationisch	

Verschiedene Polymethylmethacrylat- Partikel wurden in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss des Polymers auf die Zellaufnahme näher zu untersuchen. Sie wurden von Christoph Hauser hergestellt. Hierbei wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) als Tensid verwendet. Als

Monomere kamen die Methacrylate Methylmethacrylat (MMA), Propylmethacrylat (PMA), Isopropylmethacrylat (iPMA), Butylmethacrylat (BMA), Tertbutylmethacrylat (tBMA), Hexylmethacrylat (HMA), Cyclohexylmethacrylat (cHMA), Benzylmethacrylat (BenzylMA), Laurylmethacrylat (LMA) und Stearylmethacrylat (SMA) zum Einsatz, die sich alle in Ihrer Alkylseitenkette in Länge oder Konformation unterscheiden. Die Initiierung erfolgte mit dem Initiator V59. Methacrylate sind Ester von Acrylsäuren. Deshalb wird die Hydrophobizität der Monomere und damit des Polymers durch die Art der Seitenkette bestimmt. Je länger die Alkylseitenkette, desto hydrophober ist das Monomer und damit auch das Polymer. Außerdem gibt die Seitenkette den Ausschlag für den Glaspunkt des Polymers (T_g) und damit für die mechanische Beschaffenheit. Polymethacrylate mit mehr als vier C-Atomen in der Seitenkette (linear) besitzen einen Glaspunkt (T_{gs}), der unterhalb der physiologischen Temperatur von 37 °C liegt. Diese liegen in Zellkulturen oder im Säugetierorganismus somit als „weiche“ Partikel vor. Polymethacrylate mit weniger als vier C-Atomen und einem Glaspunkt über 37 °C hingegen, sind unter physiologischen Bedingungen als „harte“ Partikel zu betrachten. Diese Eigenschaften wurden in dieser Arbeit bzgl. des Einflusses auf die Zellaufnahme näher untersucht.

3.3 Nanopartikel als Transport-Systeme

Besonders in der Medizin ist es das Ziel, Wirkstoffe, wie Medikamente oder Wachstumsfaktoren, oder Reporter, wie Farbstoffe oder Magnetit, zu bestimmten Zielzellen zu transportieren. Durch Nanopartikel ist es möglich, diese Wirkstoffe geschützt von unerwünschten Einflüssen, wie vorzeitigem Abbau durch z.B. Enzyme der Zelle oder Degradation durch Einflüsse der Umgebung, zu transportieren^[70]. Wenn am Zielort eine Freisetzung stattfinden soll, werden meist degradierbare Polymer-Transportsysteme verwendet. Des Weiteren ist eine Freisetzung durch z.B. Porendiffusion möglich^[71].

Degradierbare Polymersysteme müssen bioverträglich sein, so dass eine gute Zellverträglichkeit gegeben ist und durch die Zersetzung des Polymers keine zellschädigenden Abbauprodukte entstehen. Deshalb wurden bisher Nanopartikel aus den hydrolysierbaren Polymeren wie Polyalkylcyanacrylat (PACA), Polybutylcyanacrylat (PBCA) und den abbaubaren Polymeren Polylactid (PL), Polycaprolacton (PCL) oder Polylactid-co-Glycolid

(PLGA) verwendet^[61, 70, 72-76].

Die Abbaugeschwindigkeit ist vom Polymer und dessen Kettenlänge abhängig. *In vitro* spielen dabei vor allem die chemischen Eigenschaften, wie Kristallinität und Hydrophobizität, das Molekulargewicht, Herstellung aber natürlich auch die Umgebung mit Temperatur, pH und Salzkonzentration eine wichtige Rolle^[61, 77-81]. Der Abbau von Polylactid, das stark hydrophob ist, dauert Monate. Polyglycolid hingegen wird wesentlich schneller, innerhalb weniger Wochen, abgebaut. Durch eine gezielte Wahl oder Kombination von Monomeren (PLGA) ist der Zeitraum der Degradation gut steuerbar.

In unserer Gruppe wurden unter anderem PBCA-Nanopartikel bereits näher untersucht^[62, 66]. Allerdings konnte in Versuchen mit PBCA-Nanopartikeln zum Teil eine hohe Toxizität dieser Partikel im *in vitro*- Versuch mit verschiedenen Zellen gezeigt werden^[62]. Diese Toxizität scheint auf die bei der Degradation der Partikel entstehenden Abbauprodukte von PBCA, n-Butanol und Polycyanacrylsäure, zurückzuführen zu sein^[56, 82-83]. Besonders PBCA mit kurzen Polymerketten und deshalb mit besserem und schnellerem Abbau, zeigten eine erhöhte Toxizität.

Weitere Transportsysteme für Freisetzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren abbaubare Polylactid-Partikel und Nanokapseln aus Polyurethan (PU) und Polyharnstoff (PH).

3.4 Anwendung von Nanopartikeln für Mesenchymalen Stammzellen

Die Forschung mit adulten Stammzellen hat in den letzten Jahren immer mehr zugenommen. Stammzellen bieten durch ihr Regenerationspotential und der Fähigkeit, zu verschiedenen Zellen und Geweben zu differenzieren, eine vielversprechende Möglichkeit in der regenerativen Medizin^[84-85]. Neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC), den Blutvorläuferzellen, die in der Lage sind, Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten auszubilden, bieten besonders die mesenchymalen Stammzellen (MSC) eine breite Verwendungsmöglichkeit in der regenerativen Medizin.

MSC haben das Potential, sich in Osteoblasten/Osteozyten (Knochenzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Adipozyten (Fettzellen) (Abbildung 3), aber auch in Myoblasten

(Muskelzellen), Stroma-Zellen (Bindegewebszellen) und Tenozyten (Sehnenflügelzellen) zu differenzieren. Des Weiteren ist die Differenzierung zu Neuronen (Nervenzellen), Epithelial-Zellen (Haut- und Drüsenzellen), Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) und Hepatozyten (Leberzellen) in der Literatur beschrieben^[86]. Somit können sie in der Medizin in einem breiten Spektrum zur Geweberegeneration verwendet werden. Für die vorliegende Arbeit sind besonders die Differenzierungen in die drei Linien in Abbildung 3 interessant (osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungslinien), die im Zusammenspiel mit Nanopartikeln näher untersucht wurden.

In der Entwicklung von Biomaterialien und der Herstellung künstlicher Gewebe gewinnt die Nanotechnologie immer mehr an Bedeutung^[87-89]. Nanopartikel stellen dabei ein vielversprechendes Werkzeug dar, da sie gezielt an die Anforderungen in der regenerativen Medizin, wie Zellmarkierung^[90], gezielte Zellauswahl - das sogenannte „Zell-Targeting“^[91], Medikament-Transport („drug delivery“)^[92-93] und Gentherapie^[94-95] angepasst werden können. Besonders MSC spielen bei der Regeneration von Knochengewebe (Osteogen)^[96], Knorpelgewebe (Chondrogen)^[96-97] (Abbildung 3), aber auch Herzgewebe^[98], wie schon erwähnt, eine wichtige Rolle durch Ihre Fähigkeit zur Differenzierung. Für viele Ansätze ist es dabei nicht nur erforderlich, eine gute Aufnahme und geringe Toxizität der Partikel in MSC zu erhalten, sondern auch dieses Differenzierungspotential durch Partikelbeladung der Zellen unbeeinflusst zu bewahren, um die Differenzierung schließlich gezielt positiv beeinflussen zu können.

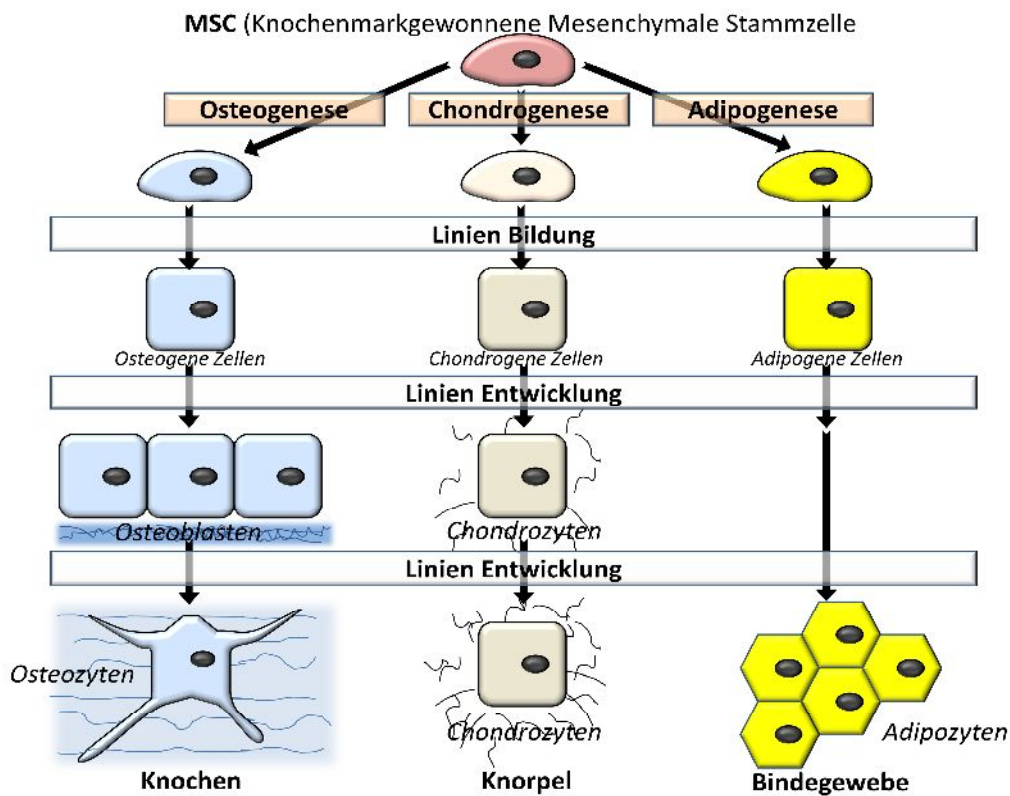


Abbildung 3: Differenzierungsschema von Knochenmark gewonnenen MSC. Über entsprechende Differenzierungsfaktoren können von MSC der osteogene, chondrogene oder adipogene Differenzierungsweg eingeschlagen werden und entsprechend Knochen, Knorpel oder Bindegewebe gebildet werden.

3.5 Bioaktive multifunktionale Beschichtungen für humanmedizinische Hartgewebeimplantate

In dem Projekt „Bioaktive multifunktionale Beschichtungen für humanmedizinische Hartgewebeimplantate“, das von der Landesstiftung Baden Württemberg finanziert wurde, war es das Ziel, Stammzellen zur Regeneration von Knochengewebe nach einer Hartgewebe-Implantation, wie einer Hüftgelenkersatz-Operation (Abbildung 4), zu rekrutieren. An dem Projekt waren mehrere Kooperationspartner beteiligt. Arbeitsgruppen der Chemie (Organische Chemie III und Anorganische Chemie II der Universität Ulm) und der Medizin/Biologie (Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik und Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm) arbeiteten Hand in Hand an diesem Projekt. Es sollten optimierte, ultradünne knochenähnliche Hydroxylapatit-Beschichtungen hergestellt werden, die durch Funktionalisierung mit biologisch wirksamen Proteinen die

Geweberegeneration aktiv unterstützen und den Wundheilungsprozess durch Freisetzung pharmakologisch wirksamer Substanzen beschleunigen. Zusätzlich sollte die Beeinflussung der Zelldifferenzierung durch die Schichten bzw. die freigesetzten Stoffe untersucht werden.

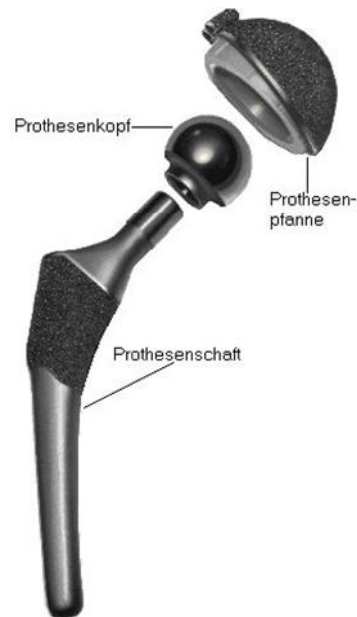


Abbildung 4: Beispiel einer modernen Hüftprothese: Sie besteht überwiegend aus dem leichten, sehr beständigen Titan, das nicht allergen ist. Bestandteile: Prothesenpfanne, Prothesenkopf und Prothesenschaft. Abbildung © MMG, Inc. 1996^[99]

Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt, die am Ende vereint werden können. Die Arbeitsgruppe von Prof. Volkmer (Anorganische Chemie II der Universität Ulm) beschäftigte sich damit, Polymethacrylat-Bürsten (PMA-Bürsten) mit einem photoaktiven Prozess^[100-101] auf TiO_2 -Oberflächen aufzubringen, die als Grundlage für die Bildung einer Calcit-Schicht dienen sollen. Dieser Prozess ist in Abbildung 5 dargestellt. Auch die Charakterisierung des Zellwachstums auf diesen modifizierten Oberflächen wurde von dieser Gruppe durchgeführt.

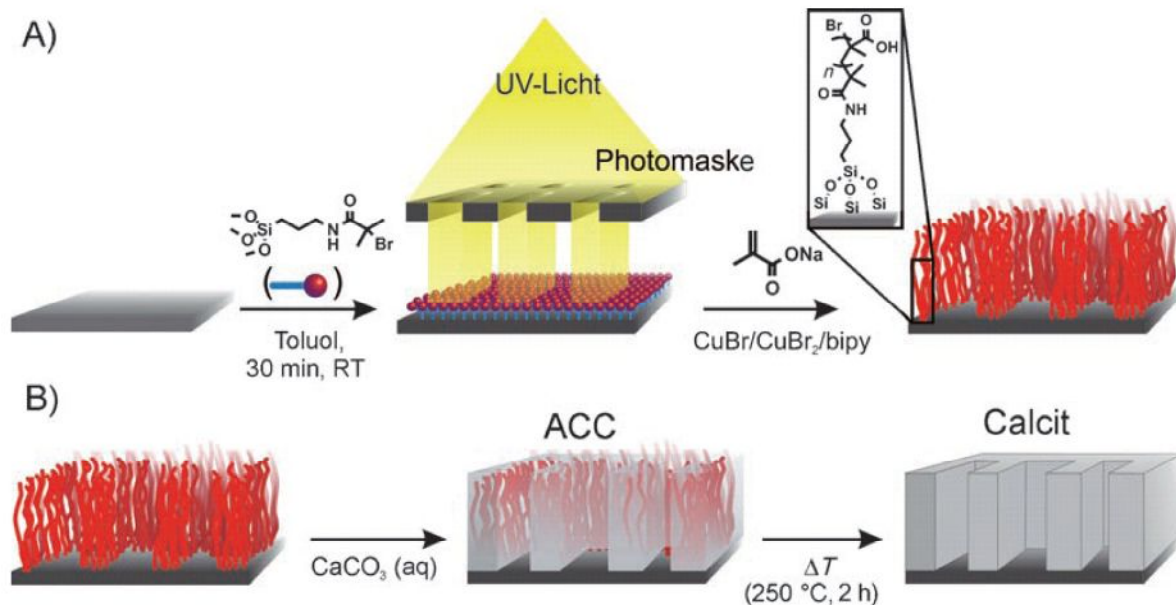


Abbildung 5: Herstellung mikrostrukturierter Mineralfilme auf Implantaten. A) Synthese von PMA-Bürsten durch SI-ATRP von Natriummethacrylat auf photolithographisch gemusterten ATRP-Initiator-funktionalisierten Substraten (bipy=2,2'-Bipyridin). B) Gerichtete Abscheidung einer dünnen Mineralschicht (hier: aus metastabilem amorphem Calciumcarbonat (ACC)) mit anschließender thermischer Umwandlung in einen mikrostrukturierten polykristallinen Komposit-Dünnschichtfilm. Abbildung von der Anorganischen Chemie 2, Prof. Volkmer.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Landfester (Organische Chemie III der Universität Ulm/Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz) hatte das Ziel, Nanopartikel oder Nanokapseln herzustellen, die zum einen auf Titanoberflächen angehaftet werden können, zum anderen bei voller Biokompatibilität in der Lage sind, Wirkstoffe zum Zellwachstum, zur Differenzierung und zur Antibiose freizusetzen. Zusätzlich wurde eine direkte Beschichtung der Partikel mit Hydroxylapatit erarbeitet, was eine direkte Funktionalisierung und knochenwachstumsaktivierende Beschichtung von Titanoberflächen ermöglicht.

Die Arbeitsgruppen von Prof. Ignatius (Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm) und Dr. Mailänder (Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik der Universität Ulm/Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz) überprüften und charakterisierten den Einfluss der Nanopartikel auf das Zellwachstum, die Viabilität und die Differenzierung der Zellen. Die Ergebnisse dieses Teils wurden in enger Zusammenarbeit erarbeitet und sind Teil der Doktorarbeit von Andrea Tautzenberger und dieser vorliegenden Arbeit.

Um MSC an ein Titan-Implantat fest zu binden, dort zu vermehren und zu knochenaufbauenden Zellen zu differenzieren, bedarf es verschiedener Voraussetzungen. Es ist nötig, den Zellen zunächst eine bessere Wachstumsoberfläche zu bieten, als dies das Titandioxid der Implantatoberfläche darstellt. Dies können Hydroxylapatit-Beschichtungen sein, aber auch einfache Schichten aus Phosphat- oder Phosphonat-funktionalisierten Polymernanopartikeln. Wenn diese Polymernanopartikel als Transportsystem von bioaktiven Stoffen synthetisiert sind, können sie diese Stoffe freisetzen. Zum Beispiel kann der gezielte Einsatz von Wachstumsfaktoren wie FGF-2^[102] die Vermehrung von Zellen fördern, die mit Hilfe verschiedener Differenzierungsfaktoren wie TGF- β , BMP-2 und -7^[103-104] zu Osteoblasten differenziert werden können (Abbildung 6), um den Knochenaufbau zu fördern. Gleichzeitig kann man mit freigesetzten Bisphosphonaten die Aktivität von Osteoklasten hemmen und so dem Knochenabbau entgegenwirken (Abbildung 6). Dadurch wird das Gleichgewicht am eingesetzten Implantat zum Knochenaufbau hin verschoben.

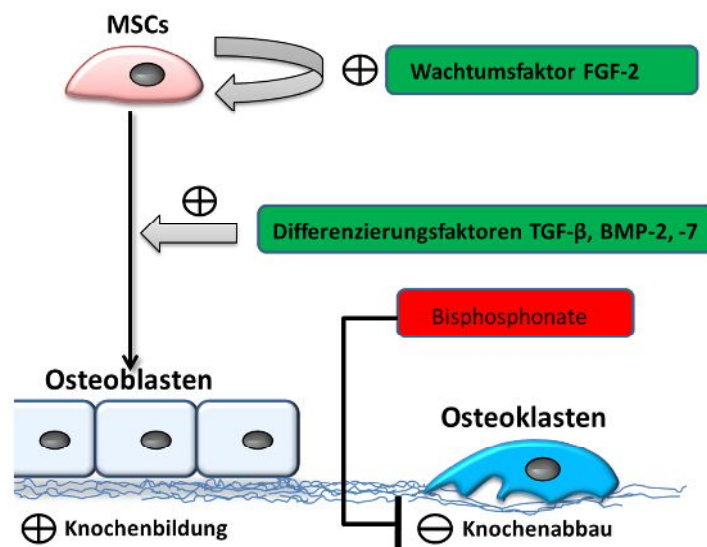


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wachstums- und Differenzierungsbeeinflussung von MSC und Aktivitätsbeeinflussung von Osteoklasten mit dem Ziel den Knochenaufbau zu begünstigen. FGF-2: Fibroblast growth factor 2, TGF- β : Transforming growth factor β , BMP-2, -7: Bone Morphogenetic Protein -2, -7.

Im ersten Schritt ging es darum, Modellpartikel, bei denen das Augenmerk nur auf die Funktionalisierung gelegt wurde, auf ihre Verträglichkeit in MSC zu testen. Diese Partikel sollten so funktionalisiert sein, dass eine optimale Bindung an Titanoxidoberflächen möglich war. Dabei war ein Abbau noch nicht erwünscht, damit Studien auch über längere Zeiträume möglich sind. Deshalb wurden hierfür Polystyrolnanopartikel von Anke Zeller hergestellt, die Phosphonat-Gruppen als Funktionalisierung auf der Oberfläche tragen (siehe auch 3.1).

In dieser Arbeit werden die Untersuchungen und Ergebnisse dieses Projektes dargestellt. Es wurden zunächst die beschriebenen Nanopartikel in freier Suspension mit MSC inkubiert, die Aufnahme der Partikel in die Zellen und die Toxizität bestimmt. Ein wichtiges Ziel des Projekts ist die Differenzierung der MSC. Diese darf durch Partikel ohne Wirkstoff nicht negativ beeinflusst werden. Die Untersuchungen wurden zusammen mit den Kooperationspartnern am Institut für Orthopädische Forschung und Biomechanik am Zentrum für Muskelskeletalforschung in Ulm bei Frau Prof. Ignatius durchgeführt. Einige Differenzierungsergebnisse sind Teil der Promotionsarbeit von Andrea Tautzenberger. Ein weiterer Schritt, der untersucht wurde, war schließlich die Beschichtung von Titansubstraten^[105] (Modell Titanoxidoberflächen) mit diesen Partikeln und der Test dieser Oberflächen auf MSC-Adhärenz und Wachstum. Die Oberflächen wurden von Anke Zeller und Kilian Schuller hergestellt.

In diese Untersuchungen eingeschlossen wurden auch Partikel, die zur zusätzlichen Biofunktionalisierung eine Schicht mit Kalzium-Hydroxylapatit besitzen. Die Bildung von Kalzium-Hydroxylapatit ist die Kalzifizierung, die Osteoblasten auf natürliche Weise durchführen und damit den Knochen aufbauen^[106]. Zunächst wurde künstlich eine Hydroxylapatitschicht geschaffen. Der verwendete Prozess ist bei *Ethirajan et al.* beschrieben^[107]. Dazu werden im ersten Schritt Kalziumionen über Kalziumnitratsalz zugegeben. Anschließend wird eine Phosphatlösung zugetropft. Dabei entsteht gemäß der Ostwaldschen Stufenregel zunächst amorphes Kalzium, das über einen Oktakalziumphosphat-Zwischenschritt, ohne Kalzinierung, direkt in einzelne Hydroxylapatit-Kristalle überführt wird (siehe Abbildung 7). Diese Arbeit wurde von Katrin Schöller durchgeführt.

4 Methoden

Dieses Kapitel dient dazu, die zur Anfertigung dieser Arbeit notwendigen Methoden näher zu erläutern. Es wird auf die Methodik des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)), des „Stimulated Emission Depletion“ (STED)- Mikroskops, des Transmissionselektronenmikroskops (TEM), des Durchflusszytometers (FACS) und des Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesers (Fluorescence Plate Reader) eingegangen.

4.1 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie betrachtet man die Fluoreszenz immer in einem Volumen des betrachteten Objekts. Deshalb kann bei der Betrachtung einer Zelle nie genau festgestellt werden, in welcher optischen Ebene sich ein Objekt befindet, bzw. ob das fluoreszierende Objekt innerhalb oder außerhalb der Zelle lokalisiert ist (Abbildung 8). Abhilfe schafft das von Marvin Minsky 1957 patentierte Prinzip der konfokalen Mikroskopie, das eine Lochblende nutzt, um optische Schnitte zu ermöglichen^[109]. Das CLSM verwendet zusätzlich als starke Lichtquellen Laser, die exakt auf den gewünschten Punkt der Anregung im Objekt fokussiert werden können. Somit wird genau Punkt für Punkt in der zu untersuchenden Ebene abgescannt. Das emittierte Licht wird hingegen durch eine Lochblende geschickt, die alles Licht außerhalb der Fokusebene zurückweist. Somit wird auch bei der Detektion nur das Licht betrachtet, das aus der gewählten Bildebene kommt. Diese Methode ermöglicht Punkt für Punkt die Darstellung eines Bildes mit der Auflösung von bis zu 200 nm in XY- und 400 nm in Z- Richtung (Abbildung 9).

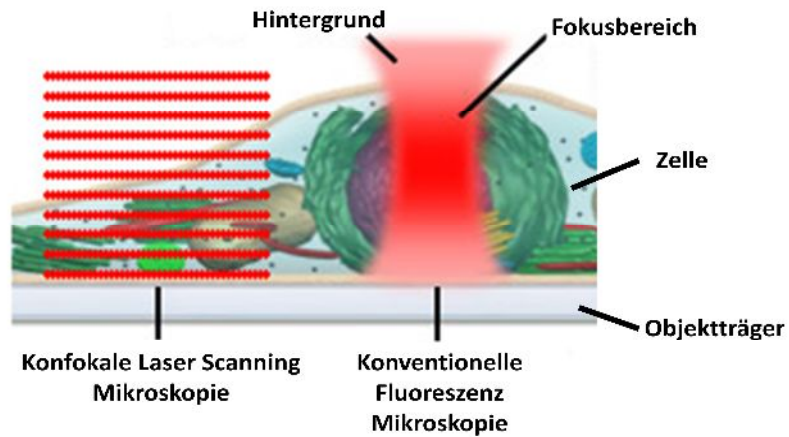


Abbildung 8: Unterschied der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie zum CLSM. Während die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie viel Hintergrundlicht außerhalb der Fokusebene abbildet und somit nur ein größeres „Fluoreszenzvolumen“ darstellt, ist es mit der konfokalen Mikroskopie möglich, optische Schnitte durch ein transparentes Objekt wie eine Zelle zu legen.^[110]

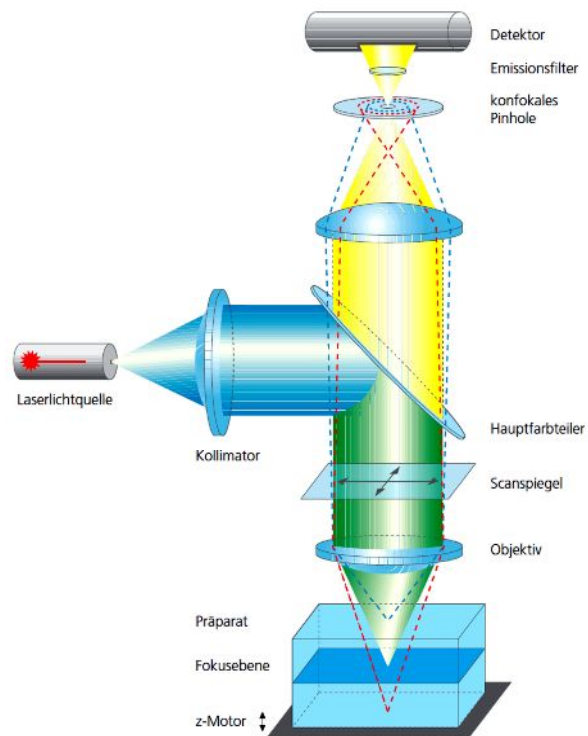


Abbildung 9: Strahlengang im CLSM. Das Laserlicht kann präzise auf einen Punkt in der Fokusebene fokussiert werden. Das entstehende Fluoreszenzlicht wird durch eine Lochblende geleitet, das Licht außerhalb der Fokusebene ausblendet (gestrichelte Linien).^[111]

4.2 Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskop

Die Auflösung in der Fluoreszenzmikroskopie ist durch das Abbesche Gesetz auf die halbe Wellenlänge und somit minimal auf etwa 200 nm in XY-Richtung begrenzt. Für viele Darstellungen besonders im biologischen Bereich ist das nicht ausreichend (z.B. Darstellung von subzellulären Strukturen, Tubulinfilamente, Kernporen, usw.). Daher entwickelte Stefan Hell 1999 das STED-Mikroskop^[112], das auf einem Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskop aufbaut. STED ermöglicht es, im Fluoreszenzbereich durch den Einsatz eines zweiten ringförmig um den ersten platzierten Laserstrahl mit einer hohen Energie und einer Wellenlänge im Bereich der emittierten Fluoreszenz eine ringförmige Abregung der Fluoreszenz durch stimulierte Emission zu bewirken, was in einem kleinerem Auflösungsfokus resultiert (Abbildung 10). Im Bereich des „Donut“ des STED-Lasers wird zunächst ein Photon durch den Anregungslaser in den angeregten Zustand versetzt. Anschließend wird dieses Photon durch stimulierte Emission im Bereich der Fluoreszenzwellenlänge des Photons wieder auf den Grundzustand zurückgesetzt. Das Photon emittiert dabei im Bereich des STED-Lasers und es entsteht kein Fluoreszenzlicht. Dieses kann nur im sehr kleinen Spot im Zentrum des „Donuts“ entstehen (Abbildung 11). Mit diesem Verfahren wurden bis zum heutigen Zeitpunkt Auflösungen von 5,8 nm (lateral) erreicht^[113], wobei kommerzielle Systeme von Leica eine Auflösung von ca. 70 nm erreichen^[114] und dabei nicht auf fixierte Präparate beschränkt sind, sondern auch die Betrachtung lebender Zellen ermöglichen^[115].

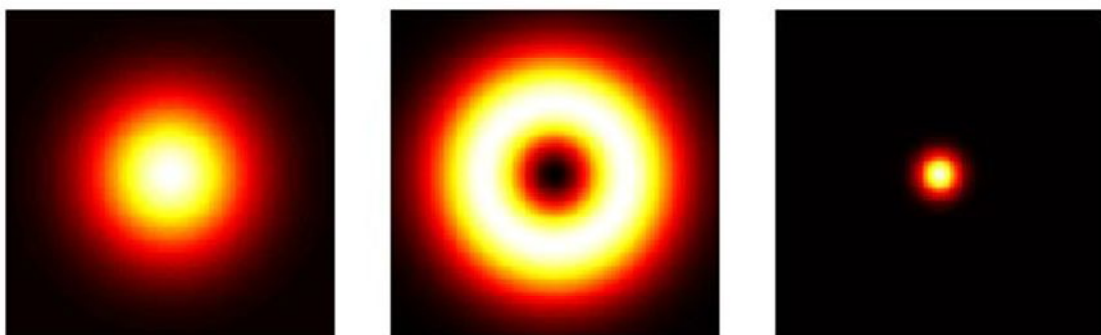


Abbildung 10: Prinzip der gesteigerten STED-Auflösung. Links im Bild der konfokale Beamspot, in der Mitte der STED Depletion Laser „Donut“, rechts der resultierende kleinere STED-Fokus-Strahl.^[116]

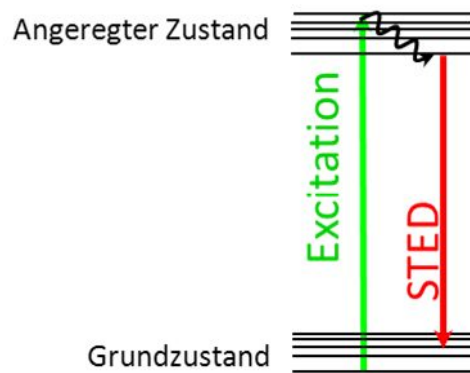


Abbildung 11: Schema der stimulierten Emission im STED-Beam. Durch die Anregungswellenlänge wird ein Photon von dem Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt. Anstatt durch Fluoreszenz in den Grundzustand zurückzufallen, wird es durch den STED-Laser, der im Bereich der Fluoreszenzwellenlänge emittiert, durch Emission im Bereich des STED-Lasers, ohne Fluoreszenz auf den Grundzustand zurückgeführt.

4.3 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Für eine höhere Auflösung ist es nötig, von der Lichtmikroskopie zur Elektronenmikroskopie zu wechseln. Sie ermöglicht Auflösungen von kleiner als 1 nm (bei 0,05 nm für ein TEAM - Transmission Electron Aberration-Corrected Microscope ^[117]), ist allerdings auf fixierte und kontrastierte Präparate angewiesen und somit auf eine Momentaufnahme beschränkt. Besonders die Präparation von Zellen gestaltet sich aufwendig, da diese Proben zur Erhaltung von Strukturen, Anfertigung von Schnitten und nötigen Kontrastierung bearbeitet werden müssen. Dabei werden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, was zu einer Vernetzung und Stabilisierung der Proteine führt. Osmiumtetroxid dient zusätzlich zur Fixierung und vor allem zur Kontrastierung. Es reagiert mit den Doppelbindungen ungesättigter Lipide und wird dabei reduziert. Das ausfallende Osmium führt zur Kontrastierung, die entstehenden zyklischen Monoester können mit Glykolgruppen reagieren und als beständige Diester für eine Vernetzung der Lipide sorgen. Anschließend können die Proben durch Ethanol dehydriert werden und lassen sich anschließend in Epon-Kunstharz einbetten. Für die Betrachtung im TEM ist es nötig, die Proben in ultradünne Scheiben zu schneiden (70-100 nm), damit der Elektronenstrahl die Probe durchdringen kann. Die Schnitte werden auf Metallgitterplättchen aufgebracht und können in das TEM eingeschleust werden.

Transmissionselektronenmikroskope ähneln im prinzipiellen Aufbau sehr den Lichtmikroskopen. Allerdings wird statt einer Lichtquelle im TEM eine Elektronenquelle in Form einer Glühkathode verwendet. Die emittierten Elektronen werden durch ein elektrisches Feld von 10 kV bis zu 125 kV zu einer ringförmigen Anode hin auf eine einheitliche Geschwindigkeit beschleunigt. Zwischen der Kathode und Anode befindet sich ein sogenannter Wehneltzylinder, der zur ersten Bündelung der Elektronen dient, aber auch die Zahl der Elektronen im Bündel und damit die Bildhelligkeit, sowie die Strahlenbelastung des Objektes variieren. Die durch die Anodenöffnung emittierten Elektronen gelangen in die Kondensorlinse, durch die eine weitere Bündelung erfolgt. Eine Veränderung der Brennweite dieser Linse variiert die Bündelung der Elektronen und beeinflusst damit sowohl Bildhelligkeit als auch Strahlenbelastung. Schließlich durchdringen die Elektronen das ultradünne Präparat. Dann wird von der Objektivlinse ein erstes vergrößertes Zwischenbild entworfen. Die darauf folgende Linse ist die Projektive, mit der das erste Zwischenbild weiter vergrößert wird und z.B. auf einen Leuchtschirm projiziert wird. Dieser Leuchtschirm kann weggeklappt werden, um die photographischen Elemente unter dem Schirm freizugeben. Dies können sowohl herkömmliche Kameras, als auch spezielle digitale Systeme sein. Die gesamte innere Säule des Elektronenmikroskops muss luftdicht verschlossen und durch entsprechendes Pumpen auf ein Vakuum von ca. 10^{-5} mbar evakuiert sein, damit die Elektronen weder an Gasmolekülen gestreut noch von diesen absorbiert werden können ^[118]. Der Aufbau des TEM ist in Abbildung 12 gezeigt.

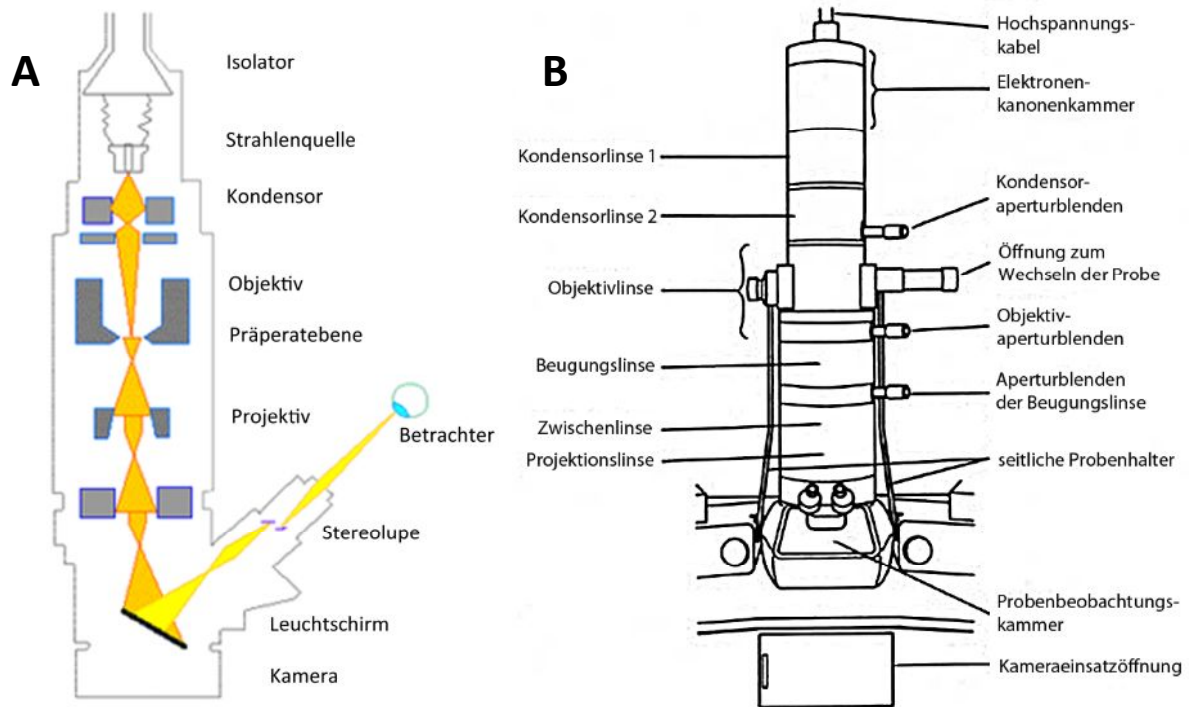


Abbildung 12: Aufbau eines TEM. Dargestellt sind der Strahlengang (A) und die Anordnung der unterschiedlichen Linsen und Blendesysteme, sowie die Elektronenquelle, die Probenzuführung und die Darstellung der Probe (A+B). ^[119-120]

4.4 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Während im TEM nur Schnitte von Zellen betrachtet werden können, eignet sich das Rasterelektronenmikroskop hervorragend zur detaillierten Darstellung von Oberflächen. Allerdings ist es nur möglich, fixierte und präparierte Zellen zu verwenden. Für eine optimale Darstellung werden diese zusätzlich mit Kohle oder Platin besputtert.

Der REM-Prozess basiert auf dem Abrastern der Probenoberfläche im Hochvakuum mit einem feingebündelten Elektronenstrahl. Dieser durch Spulen fokussierte und gelenkte Primärstrahl wird zeilenweise über die Oberfläche der Probe geführt. Bei der Interaktion des Primärstrahls mit den Atomen der Objektoberfläche entstehen Sekundärelektronen, die im SE-Detektor (Sekundärelektronen-Detektor) registriert werden und Aufschluss über die Topographie der Oberfläche geben. Dem Detektor abgewandte Flächen erscheinen heller als dem Detektor zugewandte Flächen. Die zurückgestreuten Elektronen werden über den BSE-Detektor (Back-Scattered-Electron-Detektor: Rückstreuerelektronen-Detektor) registriert. Sie bilden das Materialkontrastbild, das einen Aufschluss über die Ordnungszahl der Elemente

gibt. Leichte Elemente erscheinen dunkel (wenig Rückstreuung) und schwere Elemente erscheinen hell (viel Rückstreuung). Des Weiteren kann eine genaue Elementanalyse über die Untersuchung der detektierten Röntgenstrahlung am EDX-Detektor (Energiedespersive Röntgenanalyse-Detektor) vorgenommen werden^[121]. Der Aufbau des REM ist in Abbildung 13 dargestellt.

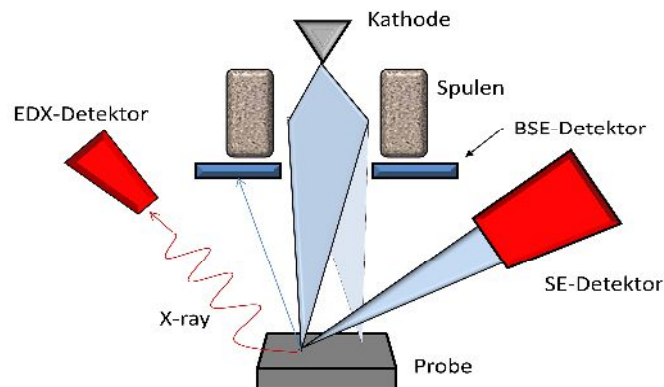


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines REM. BSE: Rückstreuerelektronen (Materialkontrast); SE: Sekundärelektronen (Topographie); EDX: Röntgen (Zusammensetzung), X-ray: Röntgenstrahlung.

4.5 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter: FACS)

Als FACS bezeichnet man die durchflusszytometrische Methode, die 1968 an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster von Wolfgang Göhde entwickelt wurde. Der erste kommerzielle Zytofluorograph wurde 1971 von der deutschen Firma Partec produziert. Der Begriff FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) ist hingegen nur ein eingetragener Markenbegriff der Firma Becton Dickinson. Zwar enthält dieser universalverwendete Begriff das Wort „Sorter“=Sortierer, aber nur in einem Teil dieser Geräte wird tatsächlich eine Sortierung der Zellen vorgenommen.

Die Methode beruht auf der Charakterisierung von Zellen oder auch Mikrometer großen Objekten aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz. Mit einer modifizierten Methode, die spezielle EMCCD-Kameras (Electron Multiplication Charge Coupled Device) und Mikroskop-Technik nutzt, ist bereits die Untersuchung von Nanoobjekten bis minimal 10 nm mit möglich^[122-123]. Beim FACS wird ein kontinuierlicher Strom aneinander gereihter

Untersuchungsobjekte erzeugt, die durch eine Messkapillare laufen und dort von einem oder mehreren Laser angeregt werden. Die Analyse der Objekte erfolgt dabei mit einer Geschwindigkeit von über 2000 Objekten pro Sekunde. Im sogenannten „Forward Scatter“ wird Licht analysiert, das nur 20° gestreut wird und somit einen Rückschluss auf die Größe des Objekts zulässt. Der „Sideward Scatter“ hingegen untersucht das 90° gestreute Licht und gibt Anhaltspunkte über die Rauheit der Oberfläche des untersuchten Objekts. Außerdem wird die Fluoreszenz des Objekts (fluorescence light: FL) in Fluoreszenzdetektoren analysiert, von denen in einfachen Geräten drei parallele vorhanden sind (Detektion von FL1-FL3), in modernen aber auch sechs oder mehr. Die Zuweisung der Fluoreszenz für jeden Kanal erfolgt durch die Fluoreszenzauftrennung durch dichroide Spiegel und durch Wellenlängen-Filter. Die Fluoreszenz kann dabei entweder vom Objekt selbst oder von einer Markierung des Objekts mit fluoreszierenden Antikörpern stammen. Bei allen im System verwendeten Detektoren handelt es sich um Photomultiplier, die in ihrer Verstärkung auf das zu untersuchende Szenario eingestellt werden müssen.

Der Einsatzbereich des FACS liegt hauptsächlich im Bereich der klinischen Routinediagnostik, der Immunologie, Hämatologie und Infektiologie. Es wird zur Klärung verschiedenster medizinischer und biologischer Fragestellungen verwendet. In neuerer Zeit wurde es durch sehr genaue und empfindliche Geräte möglich, Objekte wie einzelne Partikel im Bereich bis zu 100 nm einzeln zu untersuchen^[124-127].

Wie bereits angesprochen, ist es mit einem FACS, das eine Sortierfunktion enthält, möglich, Objektpopulationen wie verschiedene Zellen, die mit unterschiedlichem Antikörper markiert wurden, zu trennen. Dazu werden die Zellen je nach detektierter Eigenschaft einzeln elektrisch aufgeladen und in einem elektrischen Feld in unterschiedliche Gefäße gelenkt und gesammelt. Der prinzipielle Aufbau eines FACS ist in Abbildung 14 dargestellt.

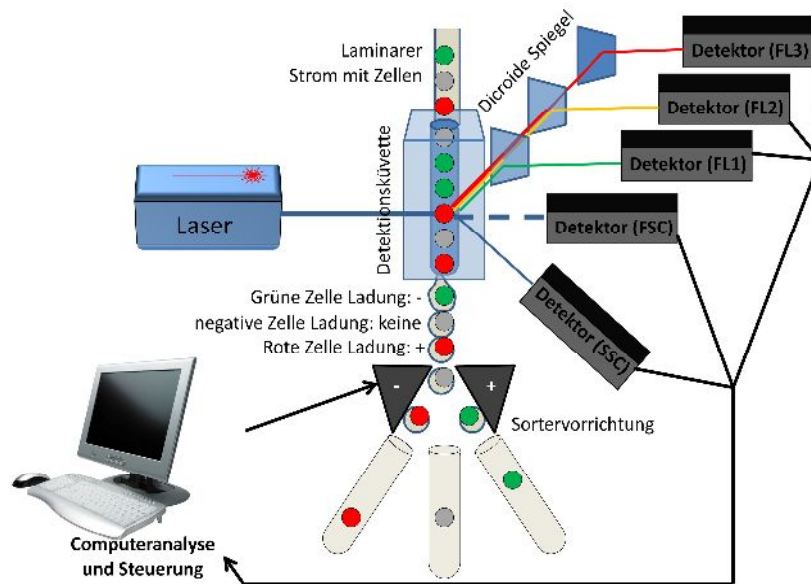


Abbildung 14: Prinzipieller Aufbau eines FACS mit Sortierfunktion. Die durch einen Laser bestrahlten Zellen im laminaren Strom werden über Detektoren auf Größe, Granularität und Fluoreszenz analysiert und am PC ausgewertet. So ist es möglich, die Tropfen, in denen sich die Zellen befinden, anschließend je nach Eigenschaft unterschiedlich aufzuladen und über ein elektrisches Feld zu sortieren.

4.6 Fluoreszenz- Microtiterplatten-Leser

Mit modernen Fluoreszenz-Microtiterplatten-Lesern (Fluorescence-Platereader) ist es nicht nur möglich, Fluoreszenzintensitäten zu quantifizieren, sondern auch deren Spektrum und zeitlichen Verlauf zu analysieren. Über verschiedene Monochromatoren kann eine große Bandbreite an Wellenlängen eingesetzt und ausgelesen werden, um damit Fluoreszenzspektren zu erstellen. Moderne Geräte besitzen nicht nur eine sehr gute Sensitivität, sondern auch eine hohe Flexibilität, die vor allem durch Monochromatoren bedingt ist. Monochromatoren sind in der Lage, einen gewissen spektralen Anteil der ankommenden Wellenlänge zu isolieren. Hierzu wird das Licht zunächst durch ein Prisma oder optisches Gitter aufgetrennt und kann durch einen einstellbaren (in Breite und Position) Spalt auf bestimmte Wellenlängen analysiert werden (Abbildung 15). Automatische Reagenzzugaben zu definierten Zeitpunkten und Kinetiken sind möglich.

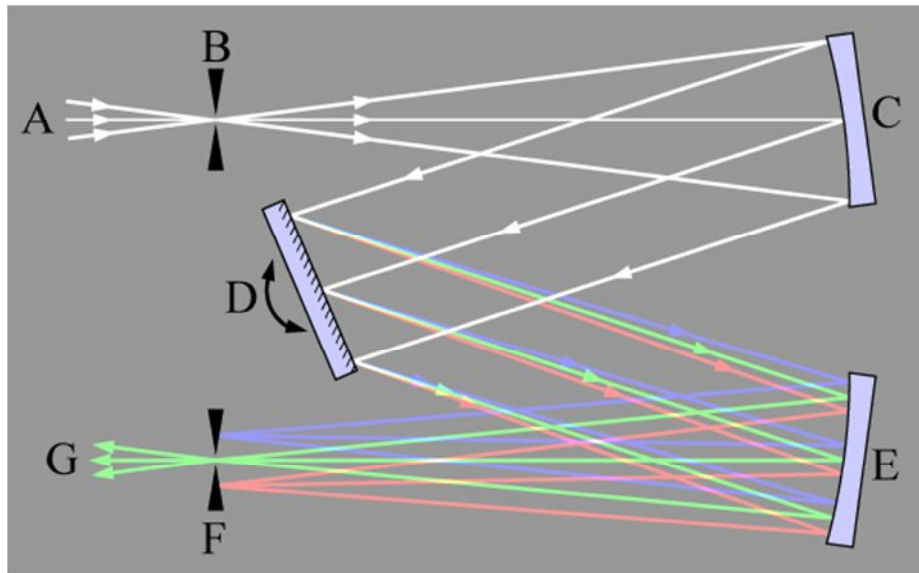


Abbildung 15: Schema eines Monochromators. A: Lichtquelle, B: Blende des eintretenden Lichts, C: Spiegel, D: Prisma/Gitter, E: Spiegel, F: Detektionsspalt, G: Detektor.^[128]

4.7 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode, die eingesetzt wird, um die Expression von Genen in Zellkultur, Geweben oder Organismen zu bestimmen. Dazu wird zunächst aus den Zellen die RNA isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase, einem Enzym, das ursprünglich aus Retroviren stammt, in die sogenannte cDNA, oder auch komplementäre DNA, übersetzt. Diese cDNA liegt im gleichen Mengenverhältnis vor, wie es die verschiedenen vorhandenen mRNAs vorher waren. Sie wird für die qRT-PCR eingesetzt. Neben spezifischen Primern zur Amplifikation der gesuchten Gentranskripte, wird ein PCR-Mix verwendet, der Taq-Polymerase und Nukleotide in einer Pufferlösung zusammen mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie SYBR[®]-Green enthält. SYBR[®]-Green fluoresziert aber nur, wenn es in die entstehenden doppelsträngigen DNA-Amplifikate interkalieren kann. Somit entsteht mit der Amplifikation eines Transskripts ein detektierbares Fluoreszenzsignal umso schneller, je mehr mRNA ursprünglich davon vorhanden war. Eine quantitative Real-Time-PCR-Maschine ist in der Lage, diese Fluoreszenzzunahme während der laufenden PCR zu detektieren und zu quantifizieren. Eine Analyse der Genexpression wird dadurch ermöglicht, dass die Expression des zu untersuchenden Gens in Relation zu einem oder besser mehreren Genen, die immer gleich exprimiert vorliegen (Housekeeping-Genen), betrachtet wird^[129-130].

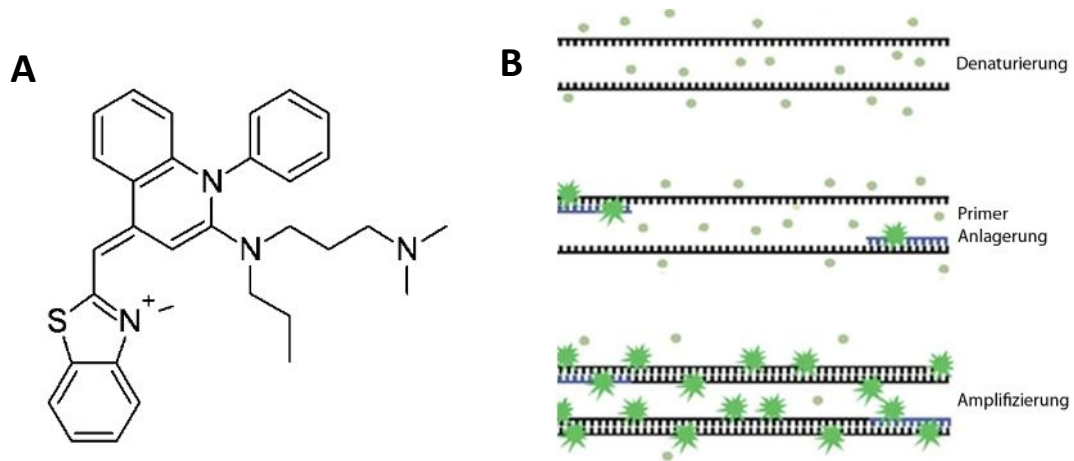


Abbildung 16: SYBR®-Green. A) Strukturformel von SYBR®-Green I.^[131] B) Sobald die Primer beginnen die cDNA zu vervielfältigen, bindet SYBR®-Green an die doppelsträngige DNA und beginnt zu fluoreszieren. ● SYBR®-Green inaktiv ★ SYBR®-Green aktiv.^[132]

5 Material und Durchführung

5.1 Material

5.1.1 Geräte

-80 °C Gefrierschrank Hera Freeze Top	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Absaugpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Germany
Brutschrank	Heraeus Instruments, Stuttgart, Germany
CLSM (confocal laser scanning microscope) (Fluoview auf IX71 mit zwei Lasern (488 nm und 543 nm) und einer 60x Öl-Linse	Olympus Hamburg, Germany
CLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica
FACScan, Messprogramm CellQuest 3.3	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
FACS CyFlow ML, Messprogramm FloMax 2.6	Partec, Görlitz, Germany
Flow S@vemate 1.2	Bioair, Siziano, Italy
Flow c-[MaxPro] ³ -130	Berner, Elmshorn, Germany
Inkubator C200	Labotect, Göttingen, Germany
Invertiertes Mikroskop CKX41 (4x/0.10, 10x/0.25 Php und 20x/0.40 Php Objektive)	Olympus, Hamburg, Germany
PCR Maschine Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany

Material und Durchführung

Plate Reader Infinite M1000, Software i-control 1.6.19.0	Tecan, Crailsheim, Germany
REM Zeiss Leo Gemini	Zeiss, Jena, Germany
RT-PCR CFX96 mit C1000 Thermal Cycler	Biorad, München, Germany
Stickstoff Zelltank LS6000	Taylor-Wharton, Mildstedt, Germany
TEM Zeiss 902	Zeiss, Jena, Germany
Vertexer Reax Control	Heidolph, Schwabach, Germany
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Germany
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, Germany

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

3-Boden Zellkulturflaschen Nunclon Surface	Nunc, Wiesbaden, Germany
Costar® 96-well Assay Plate	Corning Incorporated, NY, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
15&50mL Falcon Flasks	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
Sterile Pipettenspitzen	Biozym, Hess, Germany

Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Well-Platten für Zellkultur Cellstar	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
Zellkulturflaschen mit 3 Böden, Nunclon™ surface	Nunc, Langenselbold, Germany
Zellkulturflaschen Tissue culture Cellstar	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany

5.1.3 Reagenzien

7-Aminoactinomycin-D	Sigma, München, Germany und Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland
α -MEM (mit 20% FCS, 100 units Penicillin und 100 μ g/mL Medium Streptomycin, 1 mM Pyruvat, 0,6% Ciprobay)	Lonza, Köln, Germany
CellMask™ Membranfarbstoffe	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Ciprofloxacin	Fluka, Buchs, Schweiz
CY5 Mono NHS Ester	GE Healthcare, UK
DMEM (mit 10% FCS, 100 units Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München, Germany
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Material und Durchführung

DRAQ5 Zellkernfarbstoff	Biostatus Limited, Shepshed, Leicestershire, United Kingdom
Epon	Fluka, Buchs, Schweiz
ER-Tracker™ Endoplasmatisches Retikulum Färbung	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
FCS	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Germany
LysoTracker® Lysosomenfärbung	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
MitoTracker® Mitochondrienfärbung	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
NanoJuice® Transfektionsreagenz und Kit	Novagen-Merk, Darmstadt, Germany
Osmiumtetroxidlösung (2%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Poly-L-Lysin (361850 D Light Scattering, Vis: 574500 D) P1524, 25 mg, Lot: 093K5158	
Pyruvat	Sigma, München, Germany
RPMI (mit 10% oder 20% FCS, 100 units Penicillin und 100 µg/mL Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamine, 1 mM Pyruvat)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
SDS (Natriumdodecylsulfat), Reinheit >85%	Merck, Darmstadt, Germany
Streptomycin/Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Trypan-Blau (0,4% Lsg.)	Sigma, München,

Germany

Trypsin

Invitrogen, Karlsruhe,
Germany

TubulinTracker™ Tubulin-Färbung

Invitrogen, Karlsruhe,
Germany

5.1.4 Zelllinien

HeLa:

HeLa-Zellen sind eine der ältesten und am häufigsten verwendeten, immortalen, humanen Zelllinien^[133]. Die Linie wurde aus dem Gebärmutterhalskrebs von Henrietta Laks etabliert, nachdem sie an diesem am 4. Oktober 1951 verstarb. Diese Zelllinie ist sehr haltbar und proliferiert sehr schnell. Leider besitzt sie nach wie vor eine starke Mutationsrate, weshalb in unserem Labor alle 3 Monate neue Zellen in Kultur genommen wurden^[134].

MCF-7:

MCF-7-Zellen sind eine Brustkrebs-Zelllinie, die von einer 69-jährigen kaukasischen Frau etabliert wurde. MCF-7 ist eine Akronym für „Michigan Cancer Foundation – 7“, das sich auf die Institution in Detroit bezieht, in dem die Zelllinie 1973 von Herbert Soule und seinen Mitarbeitern etabliert wurde^[135].

LNCaP:

LNCaP-Zellen sind Zellen eines androgen-sensitiven menschlichen Prostata-Adenokarzinoms. Sie wurden 1977 von der linken supraclavicularen Lymphknoten-Metastase eines 50-jährigen kaukasischen Mannes etabliert. Die Zellen sind adhärent und wachsen in Aggregaten und als Einzelzellen^[136].

PC3:

Die PC3 menschliche Prostata-Karzinom-Zelllinie ist eine der „klassischen“ Zelllinien für Prostata-Krebs^[137]. PC3-Zellen neigen stark zur Metastasierung^[138]. Die PC3-Zelllinie wurde ursprünglich aus Knochenmetastasen des metastasierenden Prostata-Krebses etabliert. PC3-Zellen besitzen eine niedrige Testosterone-5-Alpha-Reductase-Aktivität und exprimieren Prostata spezifisches Antigen.

Jurkat:

Jurkat-Zellen sind immortalisierte T-Lymphocyten. Sie werden vor allem verwendet, um akute T-Zell-Leukämie, T-Zell-Signaltransduktion und die Expression von verschiedensten Chemokinrezeptoren bei einer Virusinfektion (vor allem bei HIV) zu untersuchen. Sie sind außerdem sehr nützlich, weil sie Interleukin-2 produzieren. Sie sind als Suspensionszellen einfach zu kultivieren und besitzen ein hohes

Proliferationsvermögen. Jurkat-Zellen wurden in den späten 70er Jahren aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen etabliert, der an T-Zell-Leukämie litt^[139]. Mittlerweile sind verschiedenste Stämme mit weiteren Mutationen in Zellkulturbanken erhältlich.

KG-1a:

KG-1a-Zellen wurden aus dem Knochenmark eines 59-jährigen kaukasischen Mannes etabliert, der an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt war. Es handelt sich bei diesen Zellen um entartete CD-34-positive Vorläufer-Zellen, die als Modell für hämatopoetische Stammzellen dienen^[140]. Sie sind mit der ebenfalls verbreiteten KG-1-Zelllinie fast identisch.

MSC:

Mesenchymale Stammzellen (Mesenchymal stem cells, MSC) sind multipotente Stammzellen, die sich in verschiedenste Zelltypen differenzieren können^[141], einschließlich Osteoblasten (Knochenzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Adipozyten (Fettzellen). Diese Differenzierung ist sowohl in vivo als auch in vitro möglich. Die in dieser Arbeit verwendeten MSC wurden aus dem Knochenmark von Hüftköpfen gewonnen, die Spender nach einer Hüft-Operation zu Verfügung gestellt haben. Diese Arbeiten sind genehmigt durch das Ethikkomitee der Universität Ulm.

5.1.5 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Sequenz 20bp-o (Original Sequenz):

5' CCA CTC CTT TCC AGA AAA CT 3' **CY5** am 5' Ende

5' CCA CTC CTT TCC AGA AAA CT 3' **TxR** am 5' Ende

Sequenz 20bp-n (Neue Sequenz):

5' ATT GCA AAT GAC GGA TCC GC 3' **CY5** am 5' Ende

5' ATT GCA AAT GAC GGA TCC GC 3' **TxR** am 5' Ende

Sequenz 40bp:

5' CCA CTC CTT TCC AGA AAA CTA TTG CAA ATG ACG GAT CCG C 3' **CY5** am 5' Ende

Sequenz 60bp:

5' CCA CTC CTT TCC AGA AAA CTA TTG CAA ATG ACG GAT CCG CAT TGC AAA TGA CGG ATC CGC 3'

CY5 am 5' Ende

Sequenz 80bp:

5' CCA CTC CTT TCC AGA AAA CTA TTG CAA ATG ACG GAT CCG CAT TGC AAA TGA CGG ATC CGC CCA CTC CTT TCC AGA AAA CT 3' **CY5** am 5' Ende

TxR: TexasRed

CY5: Cyanin-Fluoreszenz-Farbstoff 5

Alle Oligos wurden von Sigma-Aldrich, München, Deutschland bestellt und in einer Stocklösung von 100 μM geliefert.

5.2 Durchführung

5.2.1 Zellkultur

HeLa-Zellen wurden in DMEM, das mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt wurde, kultiviert. MSC wurden aus Knochenmarkaspiraten oder Hüftgelenken gewonnen, nachdem die Einverständniserklärung der Personen vorlag. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm, Deutschland, genehmigt. Primäre humane MSC wurden, wie bereits beschrieben^[142], in Kultur genommen und in α -MEM, versehen mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Medium Streptomycin, 1 mM Pyruvat und 0,6% Ciprobay, kultiviert. Die verwendeten MSC zeigen ein osteoblastisches, adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotential^[142]. Jurkat-Zellen wurden in RPMI mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat gehalten, während KG-1a-Zellen in RPMI mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat kultiviert wurden. MCF-7-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS, 100 Einheiten/mL Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt kultiviert. LNCaP und PC3 Zellen wurden in RPMI mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat gehalten. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Dazu wurden adhärenente Zellen in einer Dichte von 20.000 Zellen/ cm^2 am ersten Tag ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 1.000.000 Zellen/mL ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Partikel in einer Konzentration von 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – wenn nicht anders angegeben - in das Medium zugegeben. Auf die Zugabe eines Transfektionsmittels wurde verzichtet. Adhärenente Zellen wurden mit PBS⁻ (phosphate buffered saline: Phosphat-gepufferte Salzlösung, ohne Kalzium- und Magnesium-Ionen) gewaschen und für 3 min trypsiniert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert, z.T. gefärbt und die Zellen am Durchflusszytometer (FACS) gemessen.

5.2.2 Fluorescence Activated Cell Sorter

FACS-Messungen wurden an einem FACScan oder einem Cyflow ML durchgeführt. Die Zellen wurden mit Funktionsgraphen (Plots) von Seitwärtsstreuung zu Vorwärtsstreuung (SSC/FSC) gemessen. Fluoreszenzmessungen erfolgten im FL1-Kanal für PMI (Anregung: 488 nm, Detektion: 527 nm) und FL6 (Anregung: 640 nm, Detektion: 675 nm) für CY5 oder Sulforhodamin 101. Da die Partikel eine unterschiedliche Menge an Fluoreszenzfarbstoff (eingebetteter Farbstoff (icDye), angegeben als (w/w) enthielten, wurde der Medianwert des FL1-Kanals durch Umrechnung auf einen Fluoreszenzfarbstoffgehalt von 1000 µg Fluoreszenzfarbstoff pro Gramm Polymer normalisiert, um die Effizienz der Partikelaufnahme zwischen verschiedenen Partikeln vergleichen zu können. Für die Untersuchung der Poly(meth)acrylate, wurde die Fluoreszenz der Partikel bei 530 nm (Anregung bei 488 nm) in verdünnten Dispersionen mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen und mit folgender Formel berechnet:

$$F = \frac{I(\text{Probe})}{I(\text{Referenzprobe})} \quad (1)$$

$$nMFI_{FL1} = \frac{MFI_{FL1}}{F} \quad (2)$$

I: gemessene Fluoreszenzintensität (Spektroskopie)

F: Normierungsfaktor

nMFI_{FL1}: normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität im FL1

MFI_{FL1}: mittlere Fluoreszenzintensität im FL1 (gemessen im FACS)

Auch eine Zellzyklusanalyse mit Hilfe des FACS ist möglich. Dazu wird die DNA der Zelle mit einem DNA-interagierenden Farbstoff gefärbt, so dass die Menge an Farbstoff und entsprechender Fluoreszenz in der Zelle die Menge an DNA repräsentiert. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf den Zellzyklus-Status der Zelle ziehen (siehe Abbildung 17). Während Zellen in den Ruhephasen G₁ und G₀ nur den einfachen Chromosomensatz besitzen, fangen sie in der Synthesephase S an, ihren Chromosomensatz zu verdoppeln. In der G₂-Phase vor und während der Zellteilung (Mitose, M) besitzen sie den doppelten Chromosomen-Satz

(Abbildung 17 A). Da die meisten Zellen in Ruhephasen zu finden sind, treten diese in der FACS-Messung mit höheren Ereignissen hervor (Abbildung 17 B).

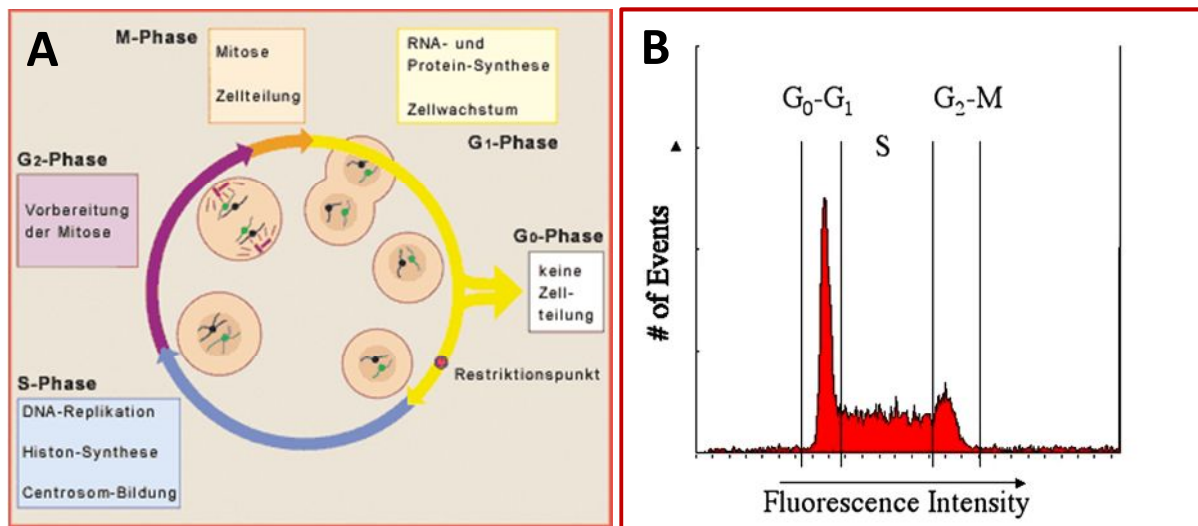


Abbildung 17: Zellzyklus. A) Darstellung des Zellzyklus einer Eukaryoten-Zelle. Die Menge an DNA je Zelle nimmt von dem einfachen Chromosomensatz in den Ruhephasen G_0 und G_1 während der Synthese-Phase (S-Phase, DNA-Amplifikation) zu bis der doppelte Chromosomensatz erreicht ist und wird nach der Ruhephase G_2 und Mitose (M-Phase) wieder auf den einfachen Chromosomensatz reduziert^[143]. B) Darstellung eines Zellzyklus in der Durchflusszytometrie. Da die gemessenen Zellen sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden (die meisten in der Ruhephase G_0), ist über die gefärbte DNA und deren Menge pro Zelle eine Einordnung im Zellzyklus möglich.

In dieser Arbeit wurden erste Zellzyklusversuche durchgeführt. Dadurch kann später eine Analyse der zellzyklusabhängigen Partikelaufnahme durchgeführt werden. Die Etablierung der Methode erfolgte zunächst mit dem Farbstoff Propidium-Iodid (PI). Dazu wurden HeLa-Zellen geerntet und 3x mit PBS^- gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL in PBS^- resuspendiert und zu 1 mL aliquotiert. Anschließend wurden 3 mL eiskalter ($-20^\circ C$) Ethanol (abs.) zugegeben und die Zellen sehr gut resuspendiert. Die Fixierung erfolgte bei $-20^\circ C$ für mindestens 1 h. Die Zellen wurden 2x mit PBS^- gewaschen und zu 1 mL PBS^+ 50 μL RNAase (10 $\mu g/mL$) zugegeben. Der RNAase-Verdau wurde bei $37^\circ C$ für mindestens 30 min durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 g für 1 min pelletiert und mit 1 mL PI-Färbelösung (50 $\mu g/mL$) für mindestens 3 h gefärbt. Danach erfolgte die Messung im FACS. PI wurde mit 488 nm angeregt und im FL2 detektiert (575 nm).

5.2.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Eine Bestätigung der intrazellulären Lokalisation der Partikel erfolgte mittels CLSM (Fluoview auf einem IX71, ausgestattet mit zwei Lasern (488 nm und 543 nm) und einem 60x Öl-Objektiv, bzw. mit einem CLSM Leica SP5 II (inverses Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 CS ausgestattet mit folgender Multi-Laser-Kombination: Ar: 458 nm ~ 5 mW, 476 nm ~ 5 mW, 488 nm ~20 mW, 496nm ~ 5 mW, 514 nm ~20 mW; DPSS: 561 nm ~20 mW; HeNe: 594 nm ~2.5 mW, 633 nm ~10 mW; STED Depletion: 592 nm 1,5 W. Objective: Vergrößerungen: 10x, 40x, 63x, 100x; HC PL Fluotar 10x/0.3 HC, PL APO CS 10x/0.4, HCX PL APO CS 40x/1.25-0.75 oil, HCX PL APO CS 63x/1.4-0.6 oil, HCX PL APO 63x/1.3 glycerine 37 °C corr., HCX PL APO CS 100x/1.4 oil, Detektor: 400-800 nm, Scan range X/Y: 60-40 mm; STED resolution: 70 nm). Fluoreszierende Polymerpartikel mit PMI wurden bei 488 nm angeregt und bei 510 bis 540 nm detektiert. Polymerpartikel mit CY5 als Fluoreszenzfarbstoff wurden mit 633 nm angeregt und bei 650-700 nm detektiert. Während eines zweiten Scandurchlaufes wurde der rot fluoreszierende Farbstoff CellMask™ Orange, der als Marker für Zellmembranen dient, bei 543 nm oder 561 nm angeregt und bei 565 nm bis 585 nm detektiert. Teilweise wurde der Zellkern der Zellen mit DRAQ®5 gefärbt. Es wurde mit 633 nm angeregt und im Bereich von 650 nm – 750 nm detektiert. Grüne Färbungen der Organellen mit MitoTracker® green, ER-Tracker® green und Tubulin-Tracker™ green wurden mit 488 nm angeregt und im Bereich von 510 bis 540 nm detektiert. Nach drei Messdatenerfassungen wurde ein Mittelwert(-Bild) gemäß der Kalman-Algorithmen bestimmt.

Studien zur Kolo­kalisierung von 2 Fluoreszenzfarbstoffen wurden am Leica SP5 II CLSM mit der Leica LAS AF Software durchgeführt. Dabei wurde als Maß der Kolo­kalisierung die „Rate of Colocalisation“ verwendet, die sich auf folgende Weise berechnet:

$$R_{col} = \frac{A_{FL1+FL2}}{A_{FL1 ges.}} \quad (3)$$

R_{col}: Rate of colocalisation: Kolo­kalisationsrate

A_{FL1+FL2}: Gemeinsame Fläche von Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2

A_{FL1 ges.}: Gesamte Fläche der Fluoreszenz 1

5.2.4 Stimulated-Emission-Depletion-Mikroskopie

Zur Auflösung einzelner Partikel in der Fluoreszenzmikroskopie wird die STED-Technik benötigt. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen CW-STED von Leica ist es möglich fluoreszierende Strukturen bis zu einer Größe von etwa 70 nm aufzulösen. Dabei sind Anregungen im Bereich von 458-514 nm möglich, die Anregungsmöglichkeit darf aber nicht in den Bereich des STED-Lasers (592 nm) liegen, da es sonst zur Reexzitation des Farbstoffs kommen kann. Die Emission muss im Bereich des STED-Lasers liegen, um STED durchführen zu können. Diese Voraussetzung ermöglicht zwar eine breite Wahl von Farbstoffen, was aber nicht deren zwangsläufige STED-Tauglichkeit bedingt. Auch Faktoren, wie z.B. die Photobleichung des Farbstoffes spielen eine entscheidende Rolle. In der Literatur sind bereits einige Farbstoffe für die Anwendung beschrieben^[144]. Das neue STED-System mit dem kontinuierlichen Laser (CW-Laser: Continuous Wave-Laser) von Leica war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit ein völlig neues System. Die Adaptierung an die nötigen Anforderungen, wie z.B. Koloalisation von Nanopartikeln mit zellulären Organellen in fixierten und lebenden Zellen, musste erst etabliert werden, ebenso wie die abgestimmte Wahl von Zellen, Zell- und Partikelfarbstoffen. In der vorliegenden Arbeit werden diese Optimierungsarbeit und die bisher gewonnen Erkenntnisse näher dargestellt.

5.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Zellen, die chemisch fixiert wurden, wurden mit 2,5% Glutaraldehyd, 1% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und in 2%iger wässriger Osmiumtetroxidlösung (Fluka, Germany) nachfixiert. Die Proben wurden in 1-Propanol-Gradientenreihen dehydriert, in 1% Uranylacetat gefärbt und in Epon eingebettet.

Zur besseren Strukturhaltung in Zellen wurde die Gefrierfixation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf kohlebedampften Saphirblättchen kultiviert. Nach 24 h Wachstum wurden die Zellen auf den Plättchen entnommen und in einem „Compact 01“ (M. Wohlwend GmbH, CH-9466 Sennwald, Switzerland) fixiert. Anschließend wurden die Proben gefriersubstituiert in einem Medium aus Aceton, 0,2% Osmiumtetroxid, 0,1% Uranylacetat und 5% Wasser für 16 h^[145]. Die Proben wurden in Epon eingebettet.

Ultradünnschnitte (80 nm) der Proben wurden mit 0,3% Bleicitrat kontrastiert und an einem Zeiss 902 TEM bei einer Spannung von 80 kV betrachtet.

Die Transmissionselektronenmikroskopie diente in dieser Arbeit dazu, die exakte intrazelluläre Lokalisation von Nanopartikel und Nanokapseln nachzuweisen. Insbesondere bei der Darstellung von Kapseln, ist eine gute Strukturhaltung der Kapselhülle nötig. In diesem Fall war die Gefrierfixation die erste Wahl. Auch Differenzierungsmerkmale von MSC konnten mit Hilfe der Technik nachgewiesen werden.

Die Durchführung der Fixationen und Präparationen wurden von Herrn Schmied (Elektronenmikroskopie, Universität Ulm) und Herrn Dr. Dass (MPI für Polymerforschung, Mainz) durchgeführt.

5.2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Zellen wurden mit 2,5% Glutaraldehyd, 1% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und in 1-Propanol-Gradientenreihen dehydriert. Danach wurden die Proben unter Verwendung eines Kritisch-Punkt-Trockners (CPD 030) getrocknet sowie rotierend in einem BAF 300-Apparat mit Platin-Kohle überzogen^[145] (Überzugsdicke: 3 nm). Die Titansubstrate mit Zellen wurden zunächst mit Ethanol fixiert und über Nacht bei 37 °C getrocknet und ohne weitere Präparation verwendet. Die Präparation wurde von Herrn Schmied (Elektronenmikroskopie, Universität Ulm) durchgeführt.

Zellen auf Titansubstraten wurden durch Ethanol fixiert. Dazu wurden die Zellen je 15 min in ein Ethanol-Wasser-Gemisch gegeben, das einen zunehmenden Ethanol-Gehalt besaß (Ethanol-Wasser 30:70, 50:50, 70:30, 90:10, 100:0). Die Proben wurden für 48 h bei 37 °C getrocknet und im REM betrachtet (80 V).

Die Proben wurden an einem Zeiss Leo Gemini im Niedervoltbereich (80-300 V) teilweise mit der Hilfe von Herrn Glaßer analysiert.

5.2.7 Toxizitätstests

Um tote und apoptotische Zellen identifizieren zu können, wurden diese mit 7-AAD (Anregung mit 488 nm, Detektion in Kanal 3, 682 nm) in einer Konzentration von 28 µg/mL^[146] 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt. Zur Analyse wurden die Proben in Triplikaten in einem FACScan oder Cyflow FL gemessen. Die Analyse auf den Anteil an lebend, apoptotisch und toten Zellen erfolgte mit Hilfe der FCS Express V3 Software (De Novo Software, CA, USA).

5.2.8 Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Messungen

Von den zu vermessenden Suspensionen oder Lösungen wurden direkt 30 µl in 96-well Platten pipettiert und unter der Software i-control™ am Plate Reader Infinite M1000 von Tecan vermessen. Vor der Messung wurde stets eine Bestimmung der optimalen Z-Position für die Messung durchgeführt. Es wurden jeweils 3-fach Ansätze gemessen. Die Vermessung von CY5-Proben im Überstand wurde mit dieser Methode durchgeführt. Die verwendeten Parameter für die Messung von CY5 sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Messparameter für die Messung von CY5-Proben am Tecan Plate Reader Infinite M1000.

Modus	Fluoreszenz Messung von oben
Exzitationswellenlänge	633 nm
Emissionswellenlänge	660 nm
Exzitationsbandbreite	5 nm
Emissionsbandbreite	10 nm
Verstärkung	100 Manuell
Anzahl der Blitze	50
Blitzfrequenz	400 Hz
Integrationszeit	20 µs
Verzögerungszeit	0 µs
Ruhezeit	0 ms
Z-Position (Manuell)	18204 µm

Bei der Auswahl der Anregungs- und Detektionswellenlängen wurde darauf geachtet, dass sie den bei anderen Methoden verwendeten Parametern (wie FACS oder CLSM) entsprechen. Alle anderen Parameter wurden bei den Messungen (bis auf z-Position, s.o.) stets unverändert gelassen.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Einfluss des Polymers und des Tensids auf die Aufnahme in Zellen^[147]

In dem ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Polymers auf die zelluläre Aufnahme untersucht. Da bereits verschiedenste Polymere für die Herstellung von Nanopartikel für zelluläre Anwendungen verwendet werden, ist diese Studie eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen von Partikel aufnehmen in Zellen. Für diese Untersuchung wurden Polymethacrylat-Partikel von Christoph Hauser synthetisiert. Die Methacrylate wurden in der Länge und Art ihrer Seitenkette variiert und somit wurden unterschiedliche Polymereigenschaften beeinflusst, wie Glaspunkt oder Hydrophobizität. Die eingesetzten Partikel sind in Tabelle 3 zu sehen. Die Tabelle gibt Aufschluss über die verwendete Menge an Tensid, die nötig war, um einheitliche Teilchengrößen von etwa 130-160 nm zu erhalten. Außerdem ist der vom PMMA zum PSMA abnehmende T_g aufgeführt, sowie das Zeta-Potential und die Oberflächenspannung der Dispersion. Wichtig ist auch, dass sich das Polymer mit PMI unterschiedlich einfärbt. Obwohl in allen Partikeln die gleiche Menge PMI eingesetzt wurde, unterscheiden sich die Farben der entstandenen Nanopartikel. Das bedeutet, dass auch das Polymer einen Einfluss auf die resultierende Fluoreszenz haben muss, was durch ein anderes packen des Farbstoffs in den unterschiedlichen Polymerpartikeln und verschiedene Quenching Effekte auftreten könnte. Dies ist somit in der Normierung der Fluoreszenzwerte zu berücksichtigen. Dies wird unter 6.1.3 näher erläutert. In Abbildung 18 sind PPMA-Partikel einer REM-Aufnahme abgebildet, die eine gute monodispere Verteilung zeigen.

Tabelle 3: Eigenschaften der fluoreszierenden Methacrylat-Nanopartikeln

Monomer	Menge an SDS [wt.% verglichen mit Monomer]	Partikelgröße x_{50} [nm]	T_g (°C)	Zeta-potential [mV]	Farbe der Polymerdispersion	Oberflächen- spannung [mN·m ⁻¹]
MMA	0.6	129	102	-37.2	Orange	13.2
PMA	1.2	126	51	-39.9	Gelb	19.8
ⁱ PMA	0.6	129	73	-39.7	Gelb	18.8
BMA	0.6	142	33	-41.0	Gelb	22.0
^t BMA	0.6	138	85	-42.2	Gelb	23.4
HMA	0.6	142	-3	-48.5	Pink	31.1
cHMA	0.6	147	78	-43.8	Pink	26.2
BenzylMA	0.6	146	47	-44.2	Pink	23.0
BenzylMA	1.2	131	52	-45.8	Pink	23.0
BenzylMA	2.4	133	52	-41.1	Pink	23.0
LMA	5.4	156	-55	-41.2	Pink	29.8
SMA	3.0	162	-65	-42.2	Pink	28.0
Glycopyranose-BMA	Ohne Tensid	144		-	Gelb	-
Glycopyranose-LMA	Ohne Tensid	150		-	Pink	-

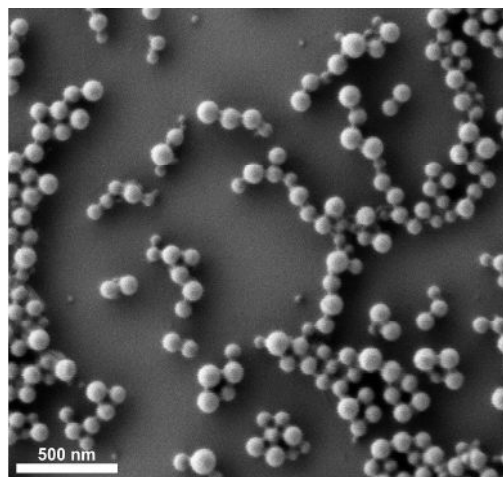


Abbildung 18: PPMA-Partikel im REM, Größenbalken 500 nm. (REM Bild von Christoph Hauser)

Auch Partikel aus den Mischpolymeren Dextran-BMA (DexBMA) und Detran-LMA (DexLMA), hergestellt über den Uzo-Effekt, wurden bzgl. Ihrer Aufnahme in Jurkat-Zellen untersucht. Es sollte sich mit dieser Untersuchung zeigen, ob ein Polymer aus Dextran mit Methacrylat-Untereinheiten ähnliche Ergebnisse in Zellen liefert. Die Eigenschaften der Partikel DexBMA und DexLMA, die von Eugen Aschenbrenner synthetisiert wurden, sind in Tabelle 3 zu finden.

Die verschiedenen Nanopartikel wurden in unterschiedlichen Zelllinien auf ihre Aufnahme und Toxizität überprüft. Dazu wurden vier klinisch relevante Zelllinien ausgewählt. Mesenchymale Stammzellen (MSC) als primäre Zelllinie und HeLa-Zellen als maligne Zelllinie sind beide adhärenente Zellen. Jurkat-Zellen wurden als Modellsystem für T-Zellen gewählt^[139, 148] und die CD34-positiven KG-1a-Zellen als Modell für hämatopoetische Stammzellen^[140]. Die letzten beiden wachsen in Suspension (siehe auch 5.1.4).

6.1.1 Toxizität der Tenside SDS und Lutensol®

Da Tenside, wie beschrieben^[69], toxische Auswirkungen auf Zellen haben können, wurde eine konzentrationsabhängige Toxizitätsstudie mit den Tensiden SDS und Lutensol® durchgeführt. Sie soll Aufschluss darüber geben, ob und welche Konzentrationen für Zellversuche problematisch sein können.

Für den Versuch wurden Stammlösungen von SDS (288,14 g/mol) und Lutensol® (2460 g/mol), die den Ausgangskonzentrationen für einen Miniemulsionsansatz entsprechen, in verschiedenen Verdünnungen zu HeLa-Zellen, einer malignen, adhärenenten und aufgrund der Entartung sehr robusten Gebärmutterhals Krebs-Zelllinie gegeben. Die Verdünnungen und Endkonzentrationen im Zellmedium nach der einheitlichen Zugabe von 10 µL zu 3mL Zellmedium sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Zellen wurden nach einer 18 stündigen Inkubation geerntet mit 7-AAD gefärbt und im FACS analysiert.

Tabelle 4: Übersicht des Versuchsansatzes mit den eingesetzten Konzentrationen

Bezeichnung und Konzentration der verdünnten Lösung	Endkonzentration im Medium [µg/mL]	Stoffmengenkonzentration [µmol/L]
1% v/v Lutensol* (58,82 µg/mL)	0,2941	11,95
5% v/v Lutensol* (294,1 µg/ml)	1,4705	59,75
10% v/v Lutensol* (588,2 µg/ml)	2,941	119,5
20% v/v Lutensol* (1176,4 µg/ml)	5,882	239
1% v/v SDS** (30 µg/ml)	0,15	52
5% v/v SDS** (150 µg/ml)	0,75	260
10% v/v SDS** (300 µg/ml)	1,5	520
20% v/v SDS** (600 µg/ml)	3	1040

Stammlösung Lutensol* (2460 g/mol): 200 mg in 34 g Wasser, d.h. 5,882 mg/mL oder 2,39 mmol/L
Stammlösung SDS** (288,14 g/mol): 72 mg in 24g Wasser, d.h. 3 mg/mL oder 10,4 mmol/L

Es zeigte sich, dass beim Einsatz von Lutensol bereits eine Konzentration von 120 $\mu\text{mol/L}$ toxisch für die Zellen ist. Mehr als 40% der HeLa-Zellen gehen in Apoptose und sterben (Abbildung 19). Hingegen war bei SDS selbst bei einer Konzentration von über 1 mmol/L keine signifikante Erhöhung der Toxizität festzustellen. 90% der HeLa-Zellen blieben am Leben, was den Werten der im Experiment mitgeführten Negativkontrolle entsprach.

Diese Werte zeigen eine hohe Toxizität des Tensids Lutensol, während das Tensid SDS selbst in höheren Konzentrationen über einen Zeitraum von 18 h keinerlei Auswirkungen auf die Vitalität von HeLa-Zellen hat. Da es sich um Untersuchungen mit freiem Tensid handelt, das nicht an Nanopartikel gebunden ist, kann man davon ausgehen, dass eine Aufreinigung von Lutensol-stabilisierten Nanopartikeln viel wichtiger ist als bei SDS. Im Umkehrschluss dürften undialysiert SDS-stabilisierte Nanopartikel im Zellversuch unproblematischer sein. Dies wurde im nächsten Kapitel (6.1.2) näher untersucht.

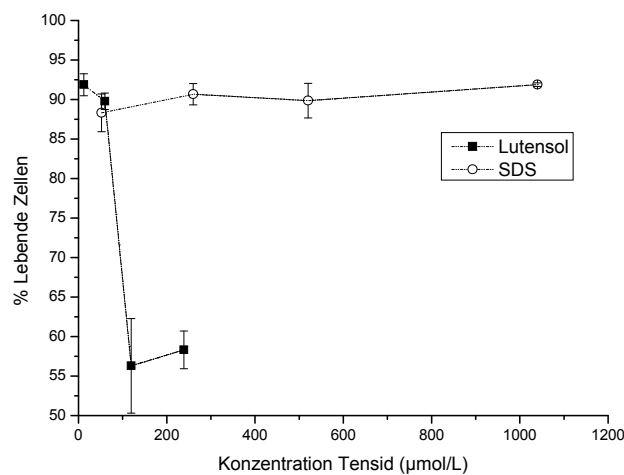


Abbildung 19: 7-AAD Test mit HeLa-Zellen in Abhängigkeit zur Tensidkonzentration. Zu sehen ist der Einfluss der Tenside SDS und Lutensol®. Die Negativkontrolle ohne die Zugabe von Tensid enthielt 95% lebende Zellen. Alle Werte sind Mittelwerte und wurden aus Doppelansätzen mit Standardabweichung bestimmt. Die Analyse erfolgte nach 18 h Inkubation mit dem Tensid.

6.1.2 Zytotoxizität der PMA-Partikel im FACS

Die Toxizität der verschiedenen Poly-Methacrylat-Nanopartikel wurde mit Hilfe des 7-AAD-Tests bestimmt, der eine Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen ermöglicht. Es konnte dabei wie im Beispiel der HeLa-Zellen kein Unterschied in der Toxizität

der Partikel zur Negativkontrolle festgestellt werden (Abbildung 20). Mehr als 95% der Zellen waren nach 18 h Inkubation noch am Leben.

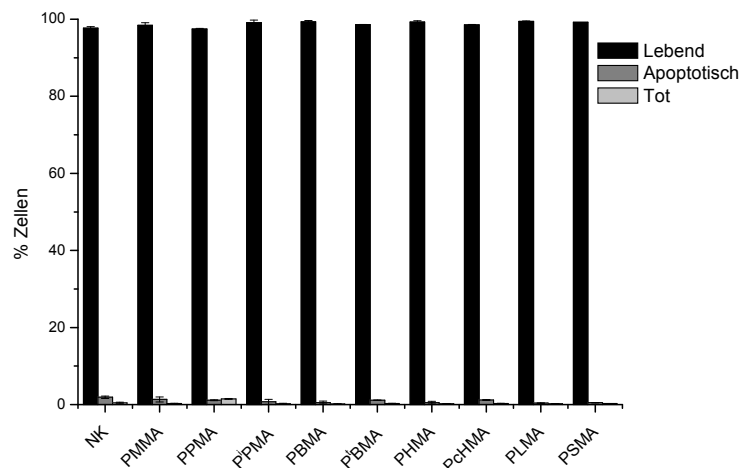


Abbildung 20: Zytotoxizität von Poly-Methacrylat-Partikeln nach 18 h Inkubation in HeLa-Zellen. Analysiert im FACS mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung. Partikelkonzentration: 75 µg/mL.

Der zelluläre Einfluss verschiedener SDS-Konzentrationen, die bei der Synthese einheitlich großer Partikel nötig waren, wurde mittels 7-AAD überprüft. Dabei konnte am Beispiel von Polybenzylmethacrylat (PBenzylMA)-Partikeln kein Unterschied der Toxizität auf die Zellen bei den unterschiedlichen SDS-Konzentrationen zwischen 0,6 bis 2,4 wt.% gefunden werden (Abbildung 21). Somit ist nicht davon auszugehen, dass die Aufnahme der hier verwendeten Polymethacrylat-Partikel mit unterschiedlichem SDS-Gehalt, durch diesen beeinflusst ist.

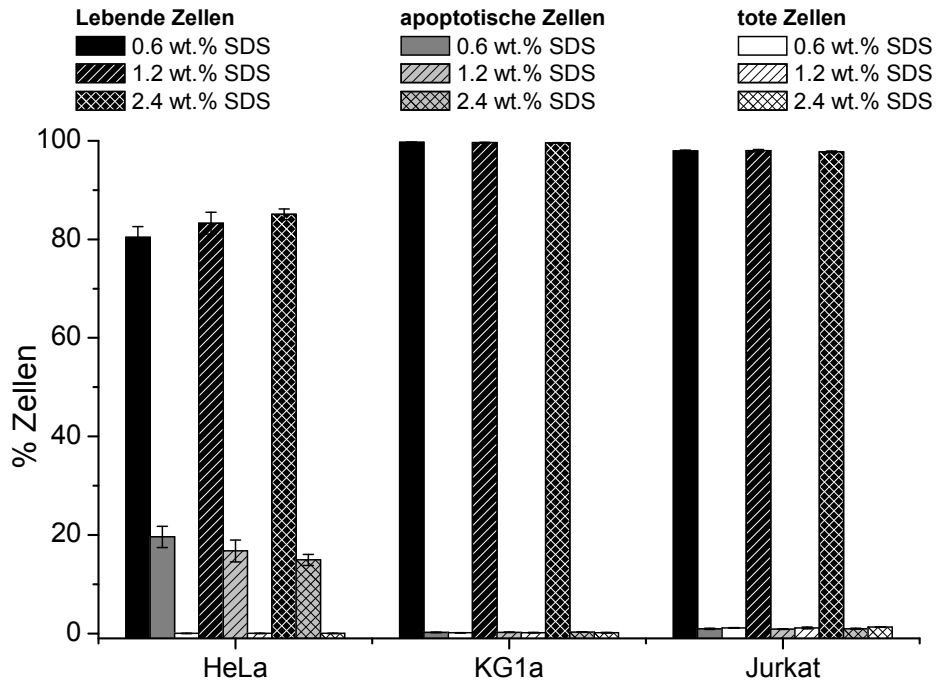


Abbildung 21: Zytotoxizität von PBenzylMA-Partikeln mit verschiedenem SDS-Mengen nach 18 h Inkubation in HeLa-, KG-1a- und Jurkat-Zellen analysiert im FACS mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung.

HeLa-Zellen zeigten eine etwa 20% höhere Apoptoserate als die anderen Zelllinien, allerdings unabhängig von der SDS-Konzentration. Da es sich bei HeLa-Zellen im Gegensatz zu KG-1a- und Jurkat-Zellen um eine adhärenzte Zelllinie handelt, kann es vorkommen, dass Apoptose durch zu dicht wachsende Zellen auftritt. Dies kann auch in diesem Versuch der Grund für die bei HeLa-Zellen beobachteten, allgemein erhöhten Apoptosewerte darstellen.

6.1.3 Partikelaufnahme im FACS

Die Aufnahme der Methacrylat-Nanopartikel in verschiedene Zelllinien wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Um die in der Durchflusszytometrie erhaltenen Fluoreszenzwerte der verschiedenen Partikel vergleichen zu können, war es nötig eine Normierung der Werte einzuführen. Da die theoretische Partikelfluoreszenz aber nicht mit der tatsächlichen übereinstimmte, lag die Vermutung nahe, dass sie durch das Polymer beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass PMI zur Aggregation in Polymeren neigen kann, was zu einer Änderung des fluoreszenzaktiven PMIs führt^[149-150]. Somit war es nicht möglich, eine Normierung auf die Menge des enthaltenen

Fluoreszenzfarbstoffs PMI durchzuführen. Deshalb wurden Fluoreszenzwerte der Polymerdispersionen in Verdünnungen von 1:50 (v/v) bis 1:500 (v/v) am Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die gemessenen Werte ergaben eine lineare Korrelation zwischen dem Feststoffgehalt der Dispersion und der Fluoreszenzintensität. Schließlich war es möglich, abhängig von der Konzentration einen Normierungsfaktor zum PMMA-Partikel einzuführen. Alle Fluoreszenzwerte wurden damit auf den PMMA-Partikel normiert. Die Normierung ist unter 5.2.2 beschrieben.

Wie schon oben beschrieben, ist es mit dem Satz von PBenzylMA-Partikeln möglich, den Einfluss der SDS-Menge auf die Zellantwort zu untersuchen. Die FACS-Daten zeigen (Abbildung 22) eine Aufnahme aller Partikel in alle getesteten Zelllinien. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Aufnahme dieser PBenzylMA-Partikel in allen Zelllinien durch die Menge an SDS, das in der Synthese verwendet wurde, ist nicht zu sehen, auch wenn in HeLa-Zellen ein minimale Steigerung der Aufnahme mit zunehmenden SDS-Gehalt angedeutet zu sein scheint. Werden allerdings die Abweichungen mit einbezogen, ist diese Annahme als nicht signifikant zu betrachten.

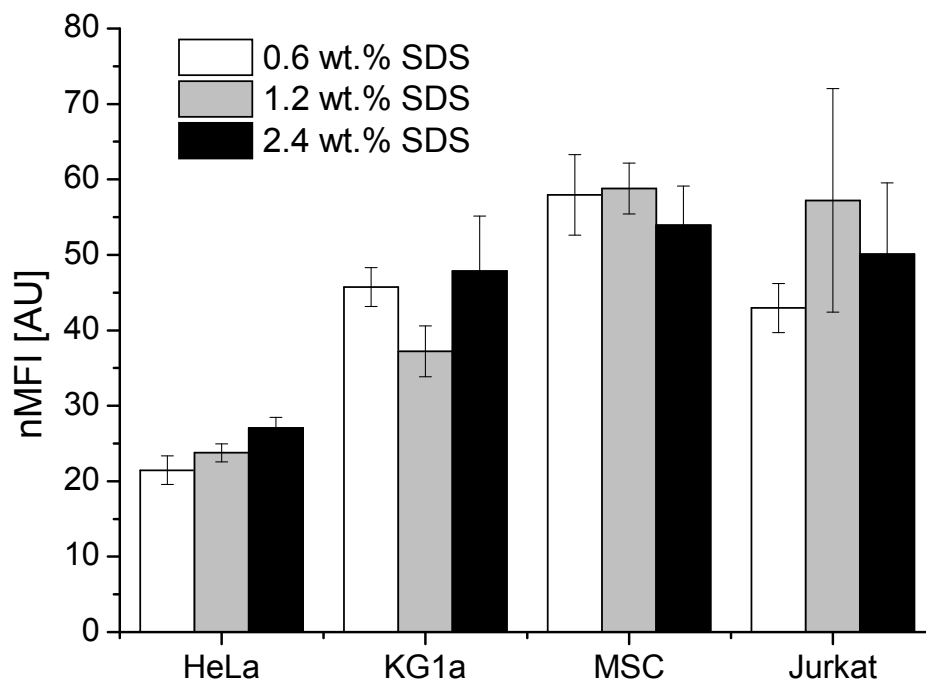


Abbildung 22: Aufnahme von PBenzylMA-Partikeln mit verschiedenen SDS-Gehalten von 0,6 und 1,2 und 2,4 wt.% in HeLa-, KG-1a-Zellen, MSC und Jurkat-Zellen nach 18 h, analysiert im FACS. *nMFI* = Normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität im *FL1* (Arbiträre Einheiten AU).

Wenn man die relativen, normierten Fluoreszenzintensitäten der Poly-Methacrylat-Nanopartikel mit linearen Seitenketten vergleicht, ist klar zu erkennen, dass in allen untersuchten Zelllinien die Polymere mit längeren Seitenketten (>C3) in höherem Maße internalisiert werden als die PMMA- (C1) und PPMA- (C3) Partikel (Abbildung 23). PBMA (C4), PHMA (C6) und PLMA (C12) zeigen bis zu 4-fach höhere Fluoreszenzwerte als PMMA und PPMA, PSMA sogar 15-fach höhere. Die Polymethacrylate mit nicht linearen Seitenketten zeigen eine ähnlich starke Fluoreszenzintensität wie PMMA und PPMA in allen Zelllinien mit einer Ausnahme (Abbildung 24). Die Fluoreszenzintensitätswerte von MSC nach Inkubation mit P^tBMA-Nanopartikeln sind extrem hoch – mehr als das 12-fache der relativen Fluoreszenzintensität der PMMA-Nanopartikel.

Die wichtigsten Parameter, die durch die Seitenketten der Poly-Methacrylat-Partikel beeinflusst werden, sind die Hydrophobizität und der T_g des Polymers. Die Hydrophobizität kann die Interaktion des Partikels mit seiner Umgebung beeinflussen, einschließlich der Serumproteine und der Zellmembran, was die Partikelaufnahme beeinflussen kann. Bezogen auf die T_g s sind PBMA- (33 °C), PHMA- (-3 °C), PLMA- (-55 °C) und PSMA- (-65 °C) Partikel „weich“ während der Internalisierung, die in Zellkultur bei 37 °C erfolgt. Die restlichen untersuchten Polymere haben alle T_g bei einer höheren Temperatur als im Experiment. Dies korreliert mit der vom PBMA zum PSMA zunehmenden Internalisierung der Nanopartikel in Zellen. Daher kann angenommen werden, dass weiche Partikel besser in die Zellen aufgenommen werden. Obwohl bisher nicht berichtet, wäre es möglich, dass die Interaktion von Nanopartikeln mit der Zellmembran bevorzugt wird, wenn sich der Partikel während der Anlagerung und Aufnahme verformen kann.

Wie bereits erwähnt, wurden P^tBMA-Nanopartikel extrem gut von MSC internalisiert, während die Aufnahme in die anderen untersuchten Zellen vergleichbar ist mit der anderer Polymerpartikel. Eine mögliche Erklärung könnte die Hydrolyse der tert-Butyl-Ester-Gruppen auf der Partikeloberfläche in der Dispersion (pH 3,2) sein, die bereits in schwach saurem Medium (pH 4,0) auf der Oberfläche von P^tBMA-Filmen beobachtet wurde^[151]. Diese Reaktion verwandelt den Ester in eine Carboxylsäuregruppe. Da carboxylierte Nanopartikel aber wesentlich besser in MSC aufgenommen werden als unfunktionalisierte

Polymernanopartikel^[152], könnte diese Hydrolyse der Grund für die erhöhte Aufnahme der P^tBMA-Nanopartikel in MSC sein.

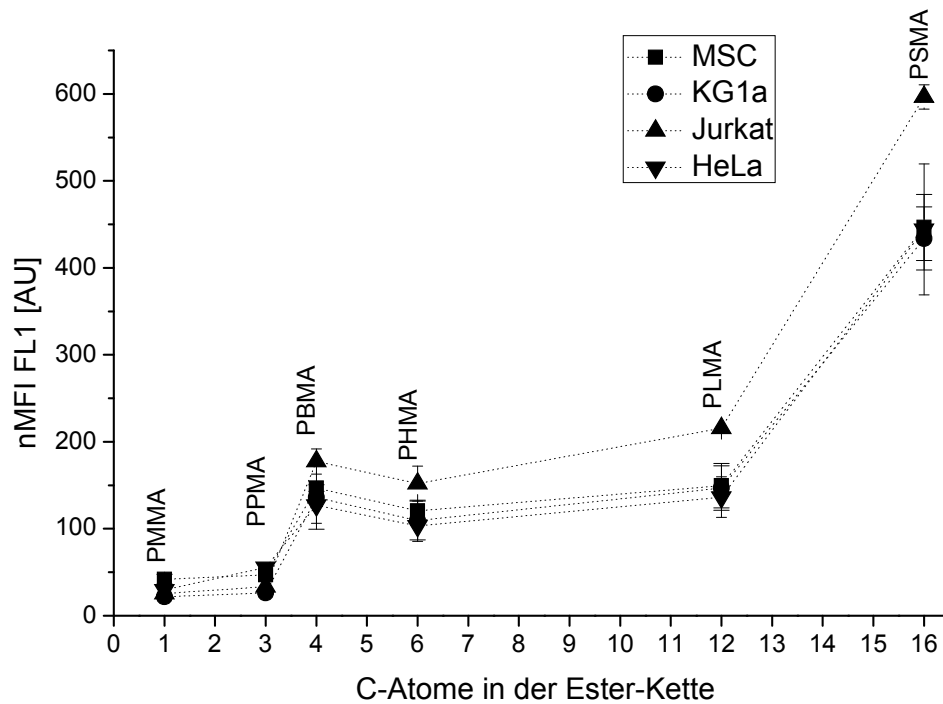


Abbildung 23: Die FACS-Analyse zeigt die Aufnahme der Partikel mit linearer Seitenkette. Die Aufnahme der Partikel wurde nach 18 h untersucht und nach zunehmender Seitenkettenlänge aufgetragen. Die Partikelnamen sind über den korrespondierenden Graphikpunkten aufgetragen. Die Fluoreszenzwerte wurden zur Partikelfluoreszenz normiert. *nMFI* = Normalisierte Mittlere Fluoreszenz-Intensität im *FL1* (Arbiträre Einheiten AU).

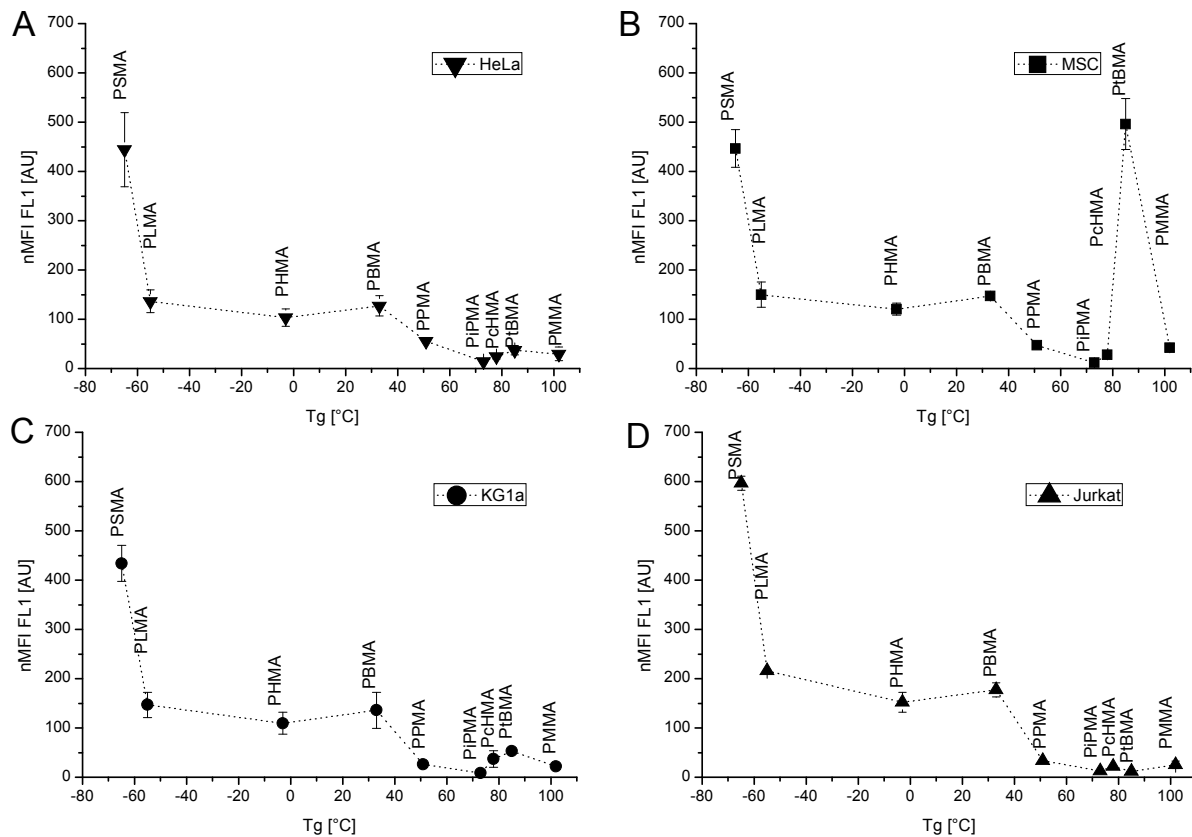


Abbildung 24: Partikelaufnahme untersucht im FACS. Aufnahme der Partikel in A) HeLa-Zellen, B) MSC, C) KG1a- und D) Jurkat-Zellen nach 18 h. Die Partikel wurden nach steigendem T_g -Wert aufgetragen. Die Partikelnamen sind über den korrespondierenden Graphikpunkten aufgetragen. Die Fluoreszenzwerte wurden auf die Partikelfluoreszenz normiert. *nMFI* = Normalisierte Mittlere Fluoreszenz-Intensität im *FL1* (Arbiträre Einheiten AU).

6.1.4 Untersuchung der Partikelaufnahme im CLSM

Da mit Hilfe der Durchflusszytometrie nicht zwischen an die Zelle angelagerten und von der Zelle aufgenommenen Partikeln unterschieden werden kann, wurde konfokale Laser-Raster-Mikroskopie durchgeführt. Durch sie ist es möglich, die fluoreszierenden Partikel zu lokalisieren und zwischen membranhaftenden und internalisierten Partikeln zu unterscheiden. In Abbildung 25 werden exemplarisch Aufnahmebilder der PMMA-, P^t BMA- und PLMA-Partikel gezeigt. Sie stehen stellvertretend für Partikel, die eine geringe Aufnahme zeigen (PMMA), Partikel die nur in eine Zelllinie gut aufgenommen wurden (P^t BMA) und Partikel, die in alle untersuchten Zelllinien gut aufgenommen wurden (PLMA). Vergleichbare Aufnahmen wurden mit den anderen Partikelsuspensionen erzielt.

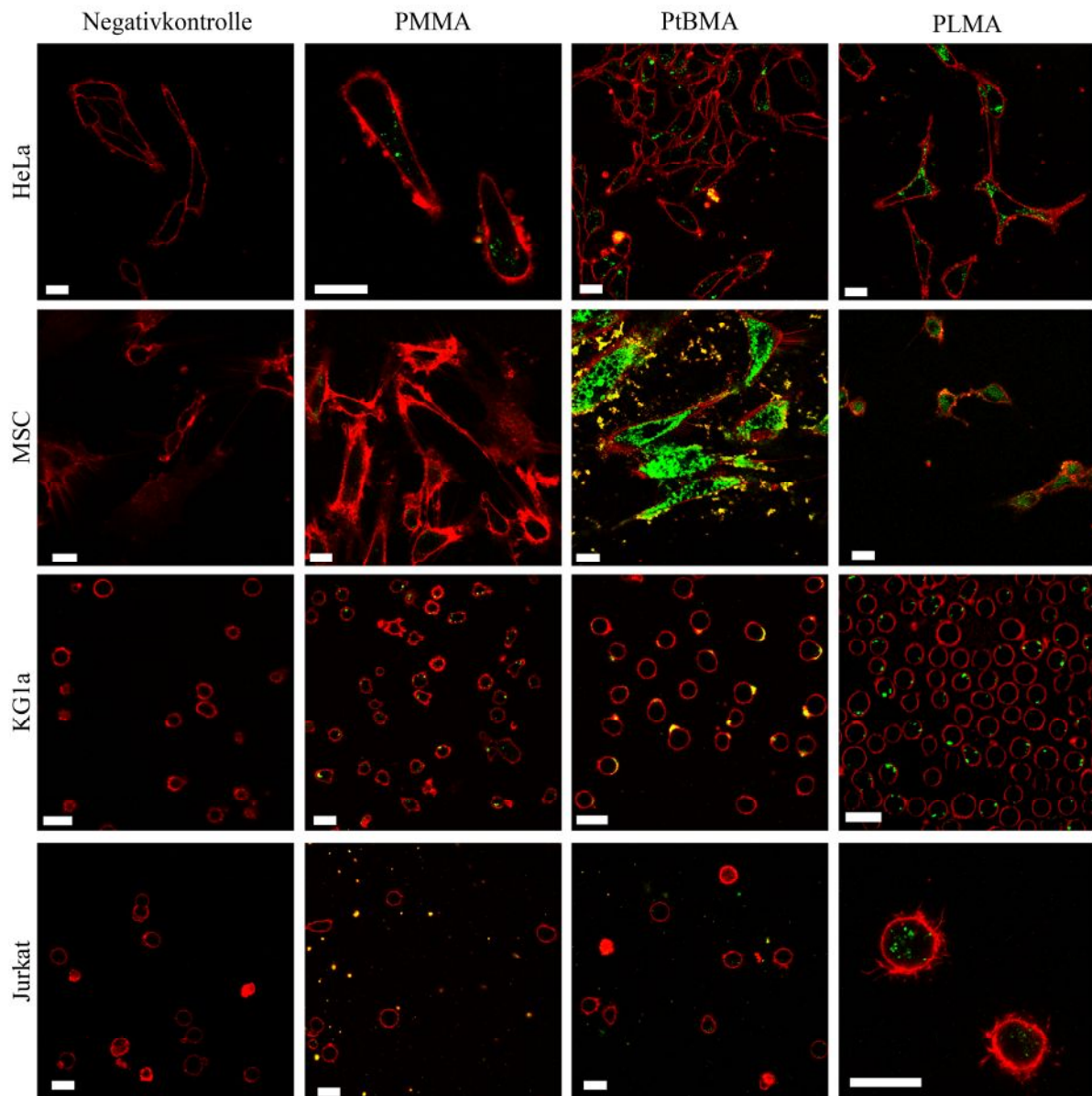


Abbildung 25: Intrazelluläre Aufnahme der Partikel in HeLa-Zellen, MSC, KG-1a- und Jurkat-Zellen im CLSM. Repräsentativ werden die PMMA-, P^tBMA- und PLMA-Partikel mit der Negativkontrolle gezeigt. Die Partikel sind in der Farbe Grün (PMI) dargestellt, die Zellmembran in der Farbe Rot (CellMask™ Orange). Die Inkubationszeit betrug 18 h, der Größenbalken zeigt 20 µm.

HeLa-Zellen zeigten eine Aufnahme aller getesteter Nanopartikel ins Zellinnere (Abbildung 25, HeLa). Während PMMA-Partikel kaum in MSC intrazellulär zu sehen waren (Abbildung 25 MSC, PMMA), waren die P^tBMA-Partikel in hohem Maß und sehr einfach zu detektieren (Abbildung 25 MSC, P^tBMA). Die Zellen waren annähernd vollständig mit P^tBMA-Partikeln gefüllt, so dass sogar membrangebundene Partikel-Cluster gefunden wurden. Dies bestätigt die hohen Fluoreszenzwerte aus den FACS-Messungen für die P^tBMA-Partikel. KG-1a-Zellen nehmen alle Polymethacrylat-Partikel in das Zellinnere auf (Abbildung 25, KG-1a), aber die

P^tBMA-Partikel wurden meistens in Clustern an der Zellmembran gefunden, wo sie sich im Overlay der pseudofarbenen roten Membran mit ihren pseudofarbenen grünen PMI gelbe Pixel darstellen (Abbildung 25, KG-1a, P^tBMA). Auch die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere war wesentlich seltener zu beobachten als bei anderen Nanopartikel-Präparationen. In Jurkat-Zellen wurden alle untersuchten Partikel intrazellulär in unterschiedlicher Menge vorgefunden, wobei keine oder kaum detektierbare membrangebundene Partikel gefunden wurden (Abbildung 25 Jurkat). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse aus den FACS-Untersuchungen von den Bildern des CLSMs bestätigt werden. In den meisten Fällen werden die Partikel internalisiert und nur wenige Partikel liegen membrangebunden vor.

6.1.5 Toxizität und Aufnahme von Detran-Methacrylat-Polymer-Partikeln

Zusätzlich zu den Methacrylat-Partikeln wurden zwei Partikel, die mit Monomeren Glycopyranose-BMA Glycopyranose-LMA polymerisiert wurden, getestet (siehe Tabelle 3). DexBMA steht stellvertretend als Polymerpartikel für Partikel mit hohem T_g , DexLMA für Polymerpartikel mit niedrigem T_g . Für diese Partikel wurde sowohl die Toxizität als auch die Aufnahme getestet. Als Zellsystem dienten Jurkat-Zellen.

Die Toxizität der Partikel mit einer 7-AAD Messung im FACS ergab keine toxischen Eigenschaften der Partikel nach einer Inkubation mit 75 µg/mL nach 18 h (Abbildung 26). Sowohl bei der Negativkontrolle der Jurkat-Zellen, als auch bei Jurkat-Zellen, die mit DexBMA- und DexLMA-Partikel inkubiert wurden, waren mehr als 95% der Zellen vital.

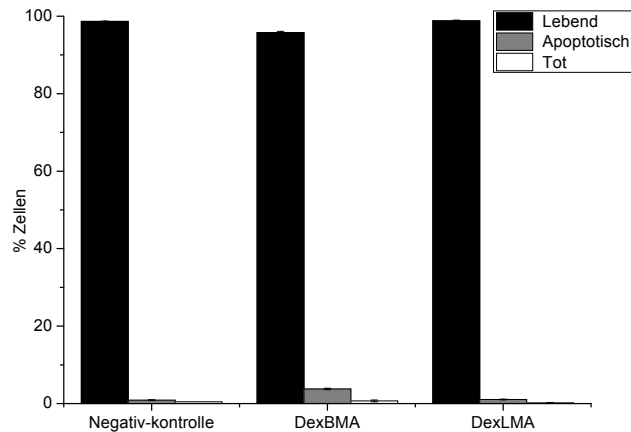


Abbildung 26: Toxizitätsmessung von Jurkat-Zellen im FACS nach 7-AAD-Färbung. Verglichen ist die Negativkontrolle mit Zellen ohne Partikel-Inkubation mit Zellen die mit 75 mg/mL der Partikel DexBMA und DexLMA für 18 h inkubiert wurden. Werte sind Mittelwerte aus einer 3-fach Bestimmung mit Standardabweichung.

Die Aufnahme der Partikel in Jurkat-Zellen wurde mittels FACS bestimmt. Partikel mit 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden für 18 h mit den Zellen inkubiert. Es zeigte sich, dass DexBMA-Partikel nur sehr schlecht, DexLMA-Partikel aber sehr gut in Jurkat-Zellen aufgenommen werden (Abbildung 27). Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen an Poly-Methacrylaten in 6.1.3. Der unterschiedliche T_g bedingt durch die Ester-Seitenketten scheint unabhängig vom Polymer Dextran eine Beeinflussung der Zellaufnahme zu bewirken. DexLMA mit längeren Ester-Gruppen bewirken eine bessere Aufnahme. Das Verhältnis der Aufnahme fällt allerdings im Fall von DexBMA- zu DexLMA-Partikel größer aus als bei PBMA- zu PLMA-Partikeln (vergleiche auch Abbildung 23).

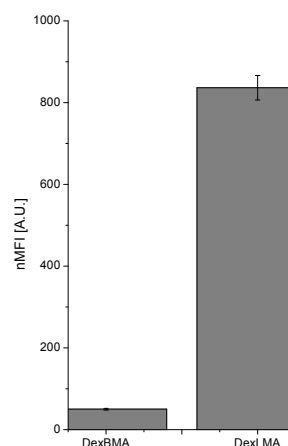


Abbildung 27: Aufnahme von DexBMA- und DexLMA-Partikel in Jurkat-Zellen quantifiziert im FACS. Inkubation von 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Partikel für 18 h. Dargestellt sind normierte Mittelwerte aus 3-fach Ansätzen mit Standardabweichung.

6.2 Aufnahme von DNA-gefüllten PBCA-Kapseln in Zellen und Freisetzung in Zellen [58, 153]

In diesem Teil der Arbeit geht es darum, die Wechselwirkungen von Nanokapseln mit Zellen zu untersuchen und das Freisetzen der verkapselten Inhaltsstoffe in Zellen nachzuweisen. In diesem Fall wurden PBCA-Kapseln verwendet (Abbildung 28), die durch eine anionische Grenzflächenreaktion in der inversen Miniemulsion von Grit Baier hergestellt wurden (siehe auch 3.1). PBCA besitzt, wie bereits vorher beschrieben, die Eigenschaft (biologisch) abbaubar zu sein^[73-74]. Zur Verkapselung wurden Nukleotide verwendet, die mit dem Fluoreszenzmarker CY5 markiert sind. Die Konzentration der eingesetzten Cy5-Oligonukleotide (wässrige Phase, siehe 3.1) betrug 6 nmol/mL. Pro Milliliter waren in der 1% Dispersion nach Redispergierung 1,2 nmol Cy5-Oligonukleotid enthalten. Cy5-Oligonukleotide dienen als Modell für das spätere Ziel, DNA zu verkapseln und in Zellen freizusetzen. Die CY5-Markierung wurde deshalb gewählt, weil sie den Vorteil hat, dass sie sehr einfach, auch in sehr kleinen Mengen, in den von uns verwendeten Messsystemen zu detektieren ist. Um den Einfluss des Tensides untersuchen zu können, wurden die synthetisierten Kapseln in drei verschiedenen Tensiden resuspendiert (anionisch, kationisch, nicht ionisch) und diese für die Versuche eingesetzt. Die verwendeten Lösungen zur Redispergierung der Kapseln waren das nicht ionische Lutensol® in 0,1 wt% wässriger Lösung (Kapsel PBCA-Lutensol), sowie das anionische SDS (Kapsel PBCA-SDS) und kationische CTMA-Cl ebenfalls in 0,1 wt% wässriger Lösung (Kapsel PBCA-Cl). Die Charakterisierung der Kapseln ergab für alle Kapseln eine Größenverteilung zwischen 270 – 330 nm nach der Redispergierung. Dies konnte im REM bestätigt werden (Abbildung 28 B). Durch Trocknungseffekte erscheinen die Kapseln im TEM kleiner (Abbildung 28 A). Pro Milliliter Kapseldispersion (1 wt%) waren nach Redispergierung $1,4 \cdot 10^{13}$ Kapseln enthalten. Bei gleichem Feststoffgehalt ist in diesem Fall auch von der gleichen Kapselanzahl pro mL Dispersion auszugehen.

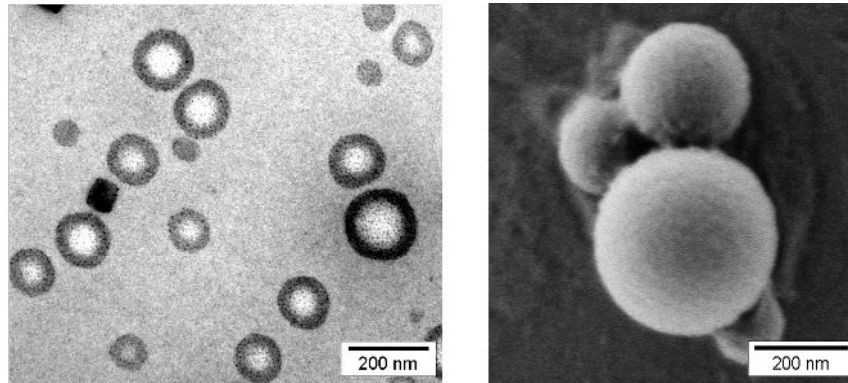


Abbildung 28: PBCA-Nanokapseln im TEM (A) und REM (B). Die Bilder wurden von Grit Baier angefertigt.

Neben den bereits beschriebenen Zellen HeLa, Jurkat und MSC wurden für diese Untersuchungen weitere adhärenzte Zellen herangezogen, um die Beobachtungen auf weitere Zellen auszuweiten. Ausgewählt wurden die Prostatakrebs-Zelllinien LNCaP und PC3, sowie die Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 (siehe auch 5.1.4).

6.2.1 Überprüfen der Dichtigkeit der Kapseln

Um sicherzustellen, dass die verwendeten PBCA-Kapseln dicht sind und keine DNA aus dem Inneren der Kapseln freigesetzt wird, bevor diese in die Zellen aufgenommen werden, wurde der Überstand der Kapseln nach Zentrifugation untersucht. Da bei der Resuspendierung der Kapseln im wässrigen Tensid-Wassergemisch auch eine Zentrifugation bei 5867 g durchgeführt wird, wurde eine Reihe an Zentrifugalkräften getestet, um festzustellen, bei welcher Zentrifugalkraft die Kapseln platzen. Dazu wurden die Kapseldispersionen der mit SDS redispergierten Kapseln mit 92 g, 367 g, 2292 g, 5867 g und 13201 g für 3 min zentrifugiert und der äquivalente Überstand von 7,5 μL einer 1% Dispersion bzw. $10,5 \cdot 10^{10}$ Kapseln/mL anschließend im Fluoreszenz-Platereader vermessen. Selbst bei der geringsten Zentrifugation mit 92 g war eine komplette Sedimentation der Kapseln zu beobachten, da neben dem klaren Überstand ein festes Pellet zu erkennen war. Der Überstand der Kapseln zeigte keine Fluoreszenz für die Proben, die mit 92-5867 g zentrifugiert wurden (Abbildung 29). Die Kapseln sind intakt, da sich im Überstand der bis zu 5867 g zentrifugierten Kapseln keine CY5 markierten Oligonukleotide befinden und dies ist auch die maximale Zentrifugalkraft, die während der Herstellung auf die Kapseln einwirkt. Nur die Proben, die mit 13201 g zentrifugiert wurden, zeigten einen fluoreszierenden Überstand (Abbildung 29).

Die Kapseln sind somit sehr stabil, da sie erst unter extremen Bedingungen (13201 g) aufbrechen.

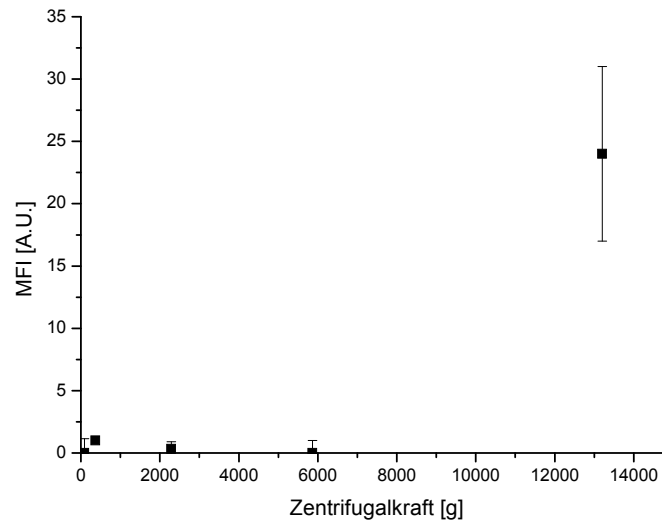


Abbildung 29: Kapsel-Stabilitätstest. Die PBCA-Kapsel (hier sind exemplarisch SDS-stabilisierte dargestellt) wurde mit verschiedenen Beschleunigungen zentrifugiert. Die Überstände der Kapseln wurden im Fluoreszenz-Plate-Reader vermessen und die zur Negativkontrolle korrigierten Daten aufgetragen. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität in A.U. (Arbiträre Einheiten). Alle Werte sind Dreifachwerte mit Standardabweichung.

6.2.2 Kapselaufnahme in Zellen gemessen im FACS

Die Aufnahme der mit CY5-Oligo gefüllten Kapseln in verschiedene Zellen wurde im FACS quantifiziert. Alle Kapseln mit den drei verschiedenen Tensiden CTMA-Cl, SDS und Lutensol AT-50 wurden mit HeLa-, Jurkat-Zellen und MSC (Abbildung 30) für 20 h inkubiert. Da es sich in allen 3 Proben um die gleichen Kapseln handelt, die nur in unterschiedlichen Tensidlösungen redispergiert wurden, wurde auf eine Normierung unter den Kapseln (auch in den folgenden Experimenten) verzichtet. Alle Dispersionen besitzen denselben Feststoffgehalt und auch die gleiche Kapselzahl pro mL Dispersion (siehe 6.2). Die Aufnahme der PBCA-Kapseln mit SDS als Tensid war immer besser als die der Kapseln mit CTMA-Cl oder Lutensol. Der positive Einfluss des Tensids SDS auf die Zellaufnahme wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt^[154]. Da einheitliche Einstellungen für die Fluoreszenzbestimmung im FACS für alle Zelllinien verwendet wurden, kann man davon ausgehen, dass die Aufnahme der Kapseln in MSC am besten ist (Abbildung 30), gefolgt von

der Aufnahme in HeLa- und Jurkat-Zellen. Die Aufnahme der CTMA-Cl Kapseln in Jurkat ist am geringsten.

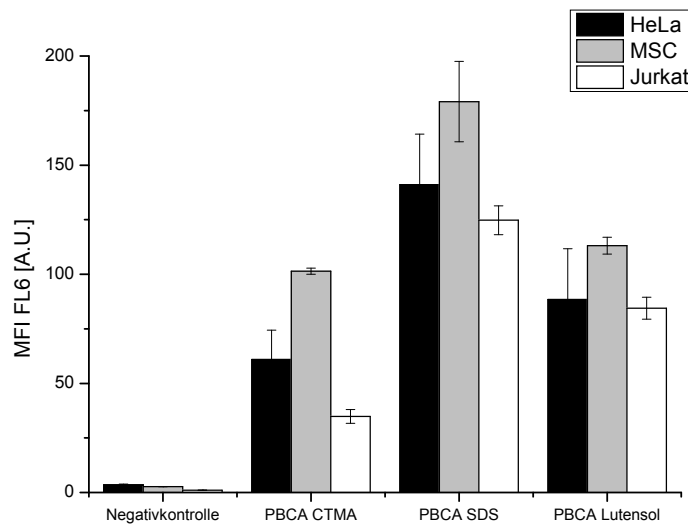


Abbildung 30: Quantifizierung der Kapselaufnahme in HeLa-Zellen, MSC und Jurkat-Zellen durch FACS. Die Zellen wurden 20 h mit Kapseln (7,5 μ L einer 1% Dispersion oder $10,5 \cdot 10^{10}$ Kapseln/mL) inkubiert, die mit den Tensiden CTMA-Cl, SDS oder Lutensol resuspendiert wurden. Die Aufnahme der Kapseln wurde durch Fluoreszenzbestimmung im Kanal FL6 (Median der Fluoreszenzintensität MFI FL6) bestimmt, in dem die Fluoreszenz des Farbstoffes CY5 detektiert werden kann. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. A.U.: arbitrary units (Arbiträre Einheiten).

6.2.3 Zytotoxizitätsbestimmung der Kapseln im FACS

Da die Zytotoxizität von PBCA seinen Abbauprodukten und den verwendeten Tensiden in der Literatur bekannt ist^[62], war es nötig, die Viabilität der Zellen in Gegenwart der PBCA-Kapseln zu überprüfen. Die Überprüfung der Toxizität der PBCA-Kapseln erfolgte in HeLa-, Jurkat-, MCF7-, PC3, LNCaP-Zellen und MSC, die für 20 h mit den PBCA-Kapseln inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine Zytotoxizitätsmessung mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung im FACS. Das Resultat ergab, dass über 85% der Zellen unabhängig von der Inkubation mit PBCA Kapseln lebendig waren. In Abbildung 31 sind exemplarisch die Ergebnisse für die Zelllinien HeLa, MSC und Jurkat dargestellt. Die PBCA-Kapseln zeigen eine sehr geringe Zytotoxizität in den getesteten Zellkultursystemen und scheinen weit besser geeignet zu sein als die früher von Weiss *et al.* verwendeten PBCA-Partikel. Weiss *et al.* verwendeten für ihre Experimente mit den Partikeln eine 100-fach höhere Tensid Konzentration zur Partikelherstellung, als sie für die Stabilisierung der Kapseln eingesetzt wurde. Zwar wurden die PBCA-Partikel

aufgereinigt, die verwendete Prozedur (Membranzentrifugation 10 x 30 min bei 3000 min⁻¹) könnte aber nicht effizient genug sein, um eine ausreichende Entfernung des Tensids zu bewirken. Auch ist die PBCA-Menge in den Partikel natürlich weit höher, so dass auch die Menge der toxischen Produkte nach der Hydrolyse (z.B. Butanol, Cyanacrylsäure) höher ist. Aber auch das Molgewicht des PBCA spielt eine Rolle. So scheint kurzkettiges PBCA toxischer zu sein, da es schneller abgebaut wird und somit fallen schneller eine große Menge an Abbauprodukten an^[62].

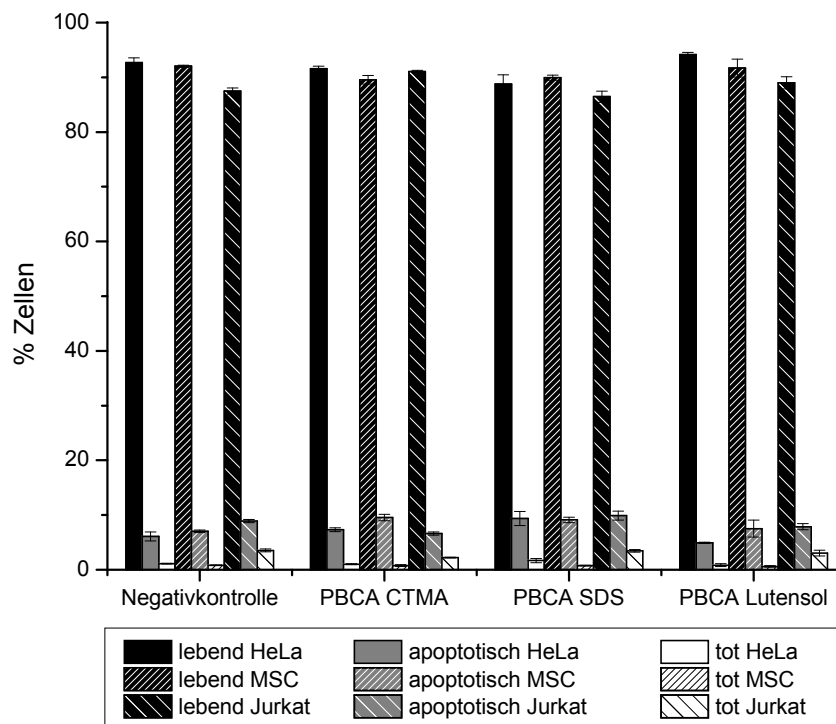


Abbildung 31: Zellviabilitätstest mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung im FACS analysiert. Gezeigt sind prozentual die lebenden, apoptotischen und toten Zellen der gesamten analysierten Zellpopulation von HeLa-Zellen, MSC und Jurkat-Zellen. CTMA-Cl-, SDS- und Lutensol-stabilisierte PBCA-Kapseln werden mit der Negativkontrolle ohne Kapselzugabe verglichen. Die Inkubation der Zellen betrug 20 h. Das Ergebnis sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

6.2.4 Untersuchungen zur Kapselaufnahme in Zellen im CLSM

Um die im FACS festgestellte Aufnahme der PBCA-Kapseln zu bestätigen und die intrazelluläre Lokalisation festzustellen, wurden CLSM-Untersuchungen nach 20 h Inkubation mit den Kapseln durchgeführt. Das Ergebnis bestätigte die Aufnahme aller 3 Kapseln (mit CTMA-Cl, SDS, Lutensol) in die getesteten Zelllinien HeLa, MSC, MCF7, PC3 und LNCaP (Abbildung 32). In allen analysierten Zelllinien sind die PBCA-Kapseln als grüne Punkte zu

erkennen, was auf einzelne Kapseln schließen lässt, oder als mehr oder weniger rund geformte subzelluläre Gebilde, die auf Kapselaggregate schließen lassen, mit Ausnahme der PBCA-SDS- und Lutensol®-Kapseln in MSC (Abbildung 32). Es sind deutlich faser-ähnliche Strukturen zu erkennen, welche bei höherer Vergrößerung noch klarer zu erkennen sind (Abbildung 33). Ein derartiges subzelluläres Verteilungsmuster wurde bisher bei den Untersuchungen mit anderen Nanopartikel nicht beobachtet. In allen Untersuchungen mit Nanopartikeln, die in unserer Gruppe oder von anderen synthetisiert wurden, wurden die Nanopartikel im TEM und CLSM immer in Endosomen oder Lysosomen gefunden^[51, 60, 63]. Von einer Freisetzung der CY5-markierten Oligonukleotide in MSC ist auszugehen, da wir zeigen konnten, dass die Kapseln zum Zeitpunkt der Zugabe zu den Zellen intakt sind (Abbildung 29). Auch den Einfluss des verwendeten Mediums auf die Freisetzung konnten wir ausschließen (Abbildung 34), indem wir HeLa-Zellen mit MSC-Medium und PBCA-Kapseln inkubiert haben und umgekehrt. Es zeigte sich nur bei MSC unabhängig vom Medium eine Anfärbung der fädigen Strukturen in der Zelle, die bei HeLa-Zellen nicht auftrat. Deshalb ist anzunehmen, dass die PBCA-SDS- und Lutensol-Kapseln in MSC ihren Inhalt, die CY5-markierten Oligonukleotide, freisetzen, die mit subzellulären Kompartimenten kolokalisieren. Die Art der Kompartimente wurde in 6.2.6 näher untersucht. Auch die Tatsache, dass Kapseln mit CTMA-Cl in MSC keine gefärbten Filament-Strukturen zeigen (Abbildung 32), konnte gezeigt werden. Dies bedeutet, dass das Tensid CTMA-Cl eine bessere Stabilisierung für die PBCA-Kapselhülle gegen die Hydrolyse bietet.

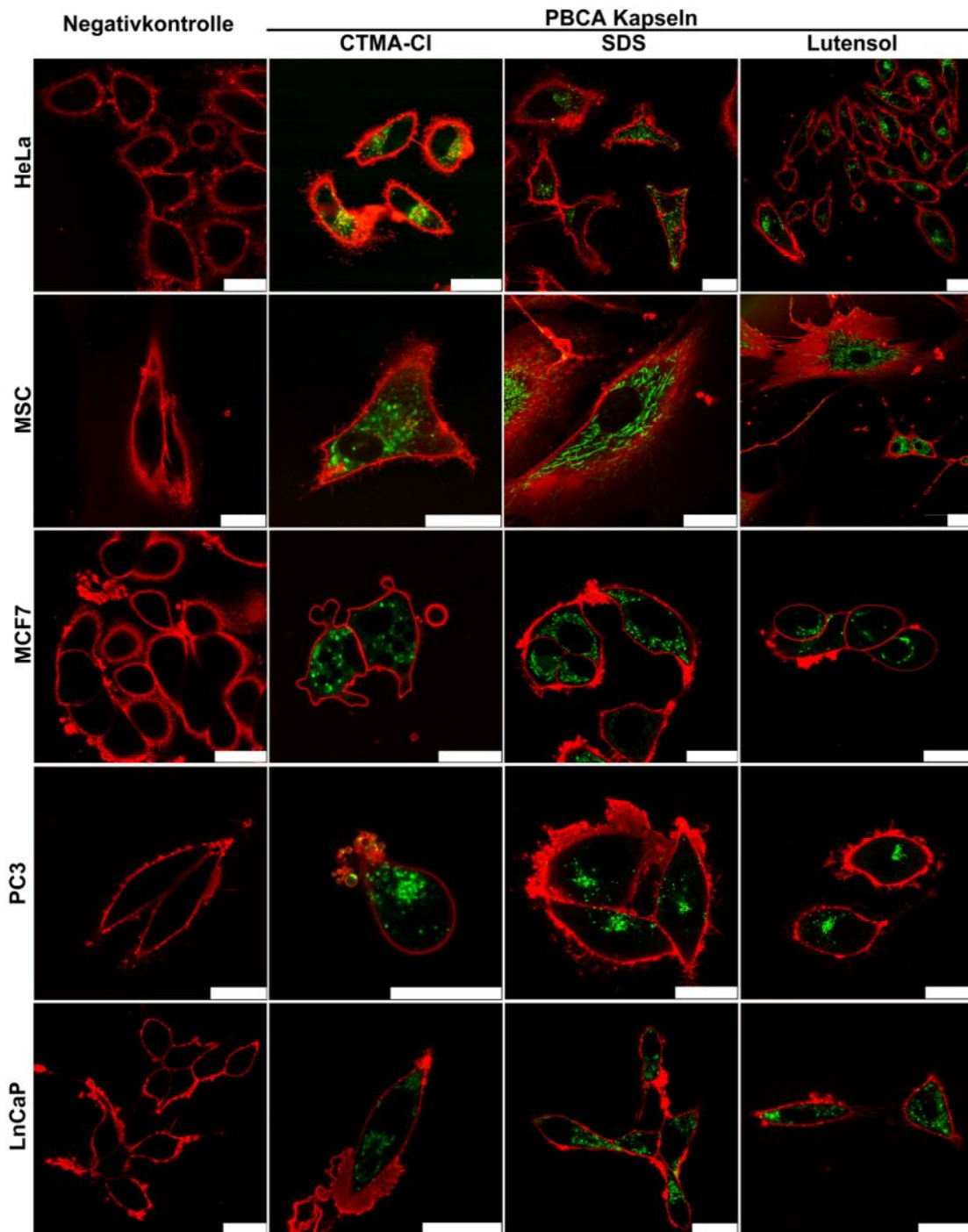


Abbildung 32: Intrazelluläre Aufnahme von PBCA-Nanokapseln bestimmt durch CLSM-Untersuchungen. Verglichen wurden unbehandelte Zellen mit Zellen, die mit PBCA-Kapseln mit den Tensiden CTMA-Cl, SDS oder Lutensol stabilisiert sind. Hiervon wurde die Aufnahme in verschiedene Zelllinien (HeLa, MSC, MCF7, PC3 und LNCaP) untersucht. Der Kapselinhalt, CY5-markierte Oligonukleotide, ist in der Farbe Grün dargestellt, die Farbe der Zellmembran, gefärbt mit CellMask™ Orange, ist rot dargestellt. Der Größenbalken entspricht 25 µm.

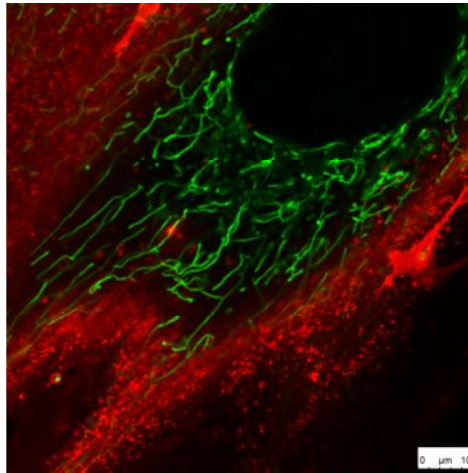


Abbildung 33: Durch PBCA-SDS-Kapseln gefärbte intrazelluläre, fädige Strukturen in einer höheren Vergrößerung. Das CY5-Oligonucleotid ist in der Farbe Grün dargestellt, die Zellmembran, gefärbt durch CellMask™ Orange, ist rot abgebildet. Der Größenbalken ist 10 μm groß.

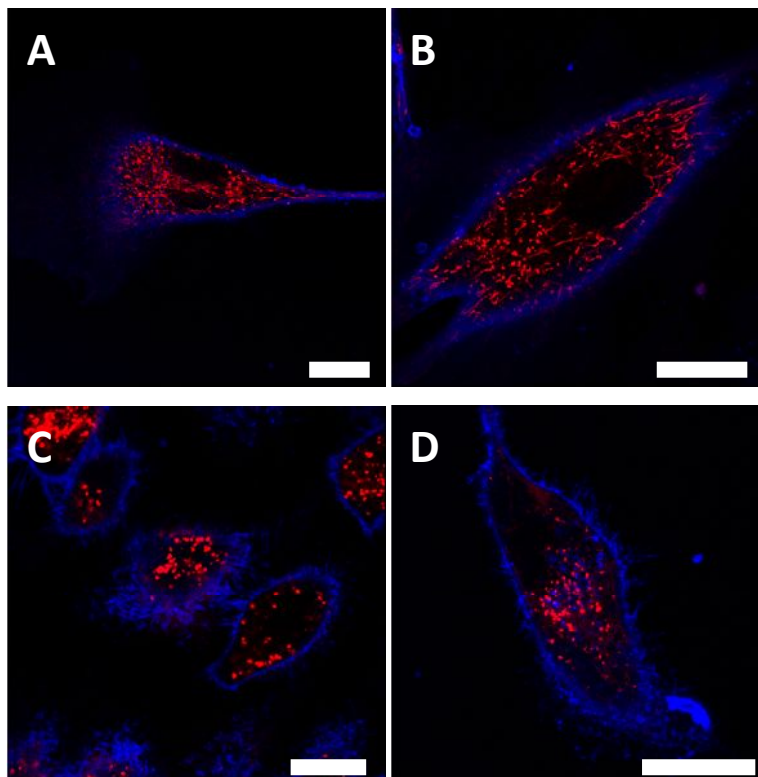


Abbildung 34: Einfluss des Mediums auf die Freisetzung der CY5-Oligonucleotide aus PBCA-Kapseln; Aufnahmen am CLSM. Alle Zellen wurden mit CY5-Kapseln inkubiert (7,5 μL einer 1% Dispersion oder $10,5 \cdot 10^{10}$ Kapseln/mL) für 20 h A) MSC inkubiert in MSC-Medium B) MSC inkubiert in HeLa-Medium C) HeLa inkubiert in HeLa-Medium D) HeLa inkubiert in MSC-Medium. Zellmembran in Falschfarben Blau (CellMask™ Orange), PBCA-Kapseln mit CY5-Oligonucleotiden in Rot, Größenbalken: 25 μm.

In weiteren Untersuchungen wurden die Aufnahme von PBCA-Kapseln und die Freisetzung der CY5-markierten Oligonukleotiden kontinuierlich über einen Zeitraum von 12 h unter Zellkulturbedingungen am CLSM mit Hilfe einer Inkubationskammer verfolgt. Bereits nach 2-4 h war eine Aufnahme der Kapseln in die Zellen zu beobachten, nach 4 h begannen sich die faserigen Strukturen in der Zelle zu färben, nach etwa 8 h war eine maximale Färbung der Filament-Strukturen in MSC zu beobachten (Abbildung 35). Das bedeutet, dass bereits 1-2 h nach der Aufnahme der Kapseln in MSC der Abbauprozess der PBCA-Kapselhülle soweit fortgeschritten ist, dass CY5-Oligonukleotide aus dem Kapselinneren freigesetzt werden, die zur beschriebenen faserigen Anfärbung in der Zelle führen. Auch über eine Zeit von 7 Tagen wurde keine Änderung dieses Phänomens für HeLa-Zellen, MSC und MCF7-Zellen beobachtet. Nur in MSC erscheinen die faserigen Strukturen, und die Färbung bleibt über die Zeit von 7 Tagen erhalten (Abbildung 36). Das bedeutet, dass nur in MSC eine Freisetzung der CY5-gelabelten Oligonukleotide beobachtet werden konnte. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass nur in MSC ein Abbau der Kapseln stattfindet, oder dass eine Anfärbung der faserigen Strukturen in anderen Zellen nicht stattfindet. Eine Degradation von PBCA-Partikeln in Zellen nach 4 h ist bereits früher publiziert worden^[155].

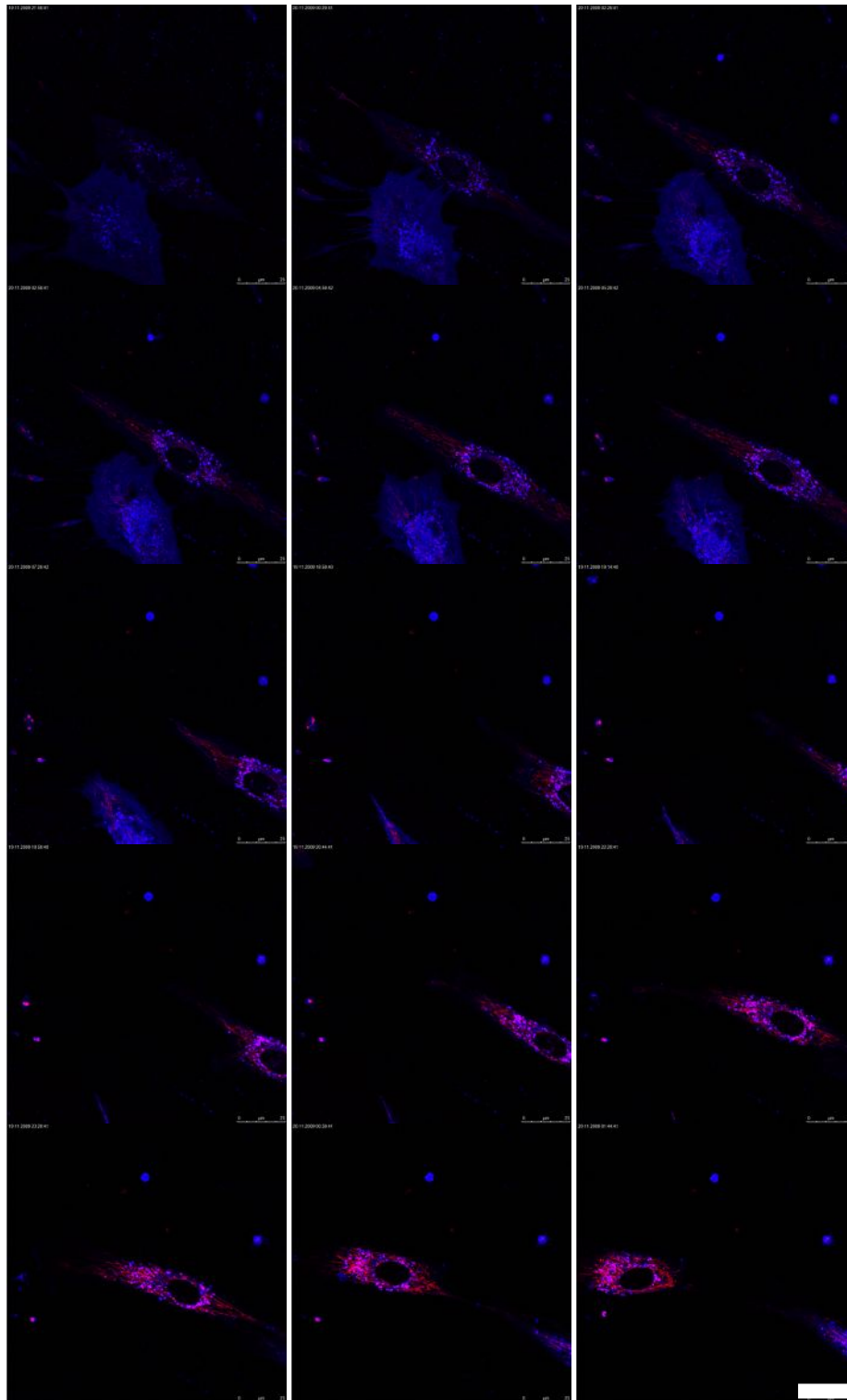


Abbildung 35: Ablauf der Aufnahme und Anlagerung von SDS-PBCA-Kapseln und der enthaltenen CY5-Oligonukleotide in MSC über einen Verlauf von ca. 15 h. Zellen sind in Blau (PKH26) dargestellt und CY5-Oligonukleotide in Rot. Die gezeigten Bilder sind im Abstand von 1 h entstanden. Zu beachten ist, dass die beobachtete Zelle wandert. Der Größenbalken im letzten Bild steht stellvertretend für alle Bilder: 25µm.

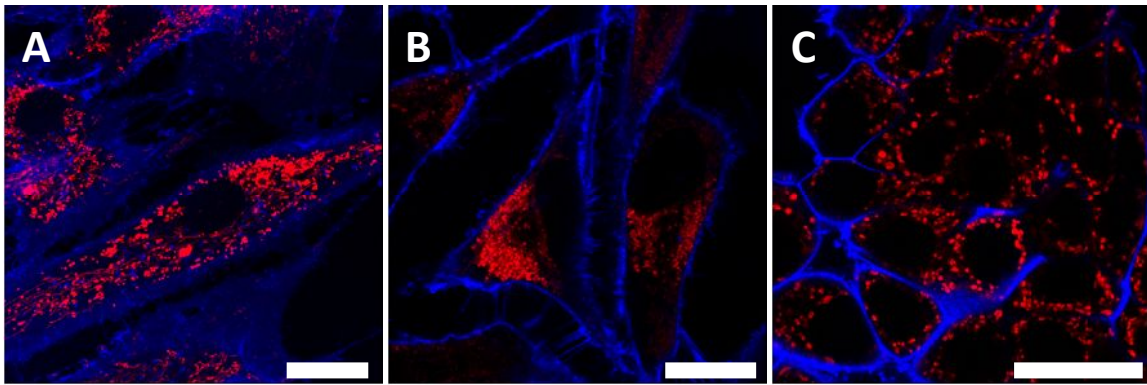


Abbildung 36: Zellen mit SDS-stabilisierten PBCA-Kapseln, die CY5-Oligonukleotide enthalten, im CLSM nach 6 Tagen Inkubation. A) MSC B) HeLa-Zellen C) MCF-7-Zellen. Zellmembran Falschfarben blau (CellMask™ Orange), PBCA-Kapseln mit CY5-Oligonukleotiden in Rot, Größenbalken: 25 μm .

Um sicherzustellen, dass die faserige Färbung in den MSC durch die CY5-markierten Oligos bedingt ist, wurden exakt die gleichen Oligonukleotide, nur nicht verkapselt, im Medium mit den MSC für 20 h inkubiert. Das Ergebnis zeigt die gleichen faserigen Färbungen auch mit purem CY5-gelabelten Oligonukleotiden, die mit den Kapseln zu beobachten waren (Abbildung 37), was auf die erfolgreiche Freisetzung von CY5-gelabelten Oligonukleotiden als Quelle für diese faserigen Strukturen schließen lässt.

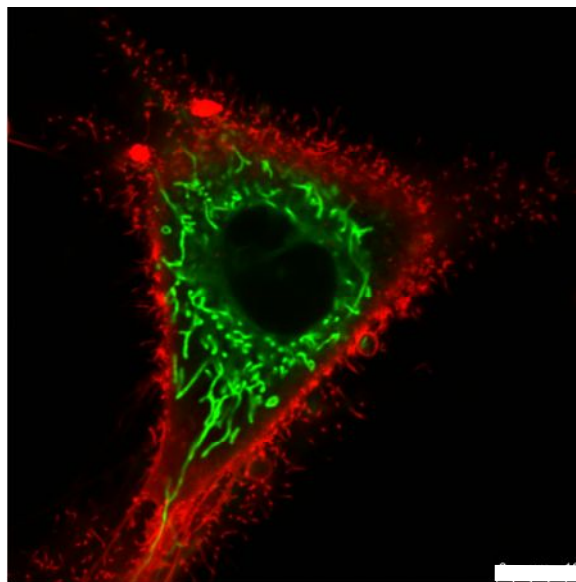


Abbildung 37: CLSM-Aufnahme einer MSC, die mit nicht verkapseltem CY5-Oligonukleotiden für 20 h inkubiert wurde. Rot gefärbt ist die mit CellMask™ Orange gefärbte Zellmembran zu erkennen, grün gefärbt sind die faserigen Strukturen durch die CY5-Oligo zu sehen. Der Größenbalken beträgt 10 μm .

Eine Freisetzung der CY5-gelabelten Oligonukleotide in MSC ist durch diese Versuche belegt. In den anderen Zelllinien ist diese Freisetzung mangels der nicht zu beobachtenden Färbung der faserartigen Strukturen in den Zellen nicht zu beweisen, oder sie findet nicht statt.

Welche faserartigen Strukturen in der Zelle durch die CY5-gelabelten Oligonukleotide angefärbt werden bzw. mit welchen zellulären Strukturen diese interagieren, wurde in weiteren Studien unter 6.2.6 gezeigt.

6.2.5 Kapselaufnahme in Zellen (TEM)

Um die exakte intrazelluläre Lokalisation und den Verbleib der PBCA-Kapseln in MSC und eventuelle Kolokalisationen der Kapseln mit Zellorganellen zu zeigen, wurde transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von MSC durchgeführt, die mit PBCA-SDS-Kapseln (30 μL einer 1% Dispersion oder $4,2 \cdot 10^{11}$ Kapseln/mL) für 20 h inkubiert waren. Die Präparation erfolgte zur besseren Strukturhaltung durch Gefrierfixation (5.2.5) durch Herrn Dr. Dass. Da in den Zellen Kapseln mit der erwarteten Größe gefunden wurden (Abbildung 38, schwarze Pfeile), die in der Negativkontrolle fehlen, konnten wir die Aufnahme der Kapseln in die Zellen bestätigen, die im CLSM zu sehen ist. Eine Kolokalisation mit zellulären Organellen konnte aber nicht entdeckt werden. Es wurden intakte Kapseln gefunden, was allerdings eine Freisetzung des Inhaltes der Kapseln nicht ausschließt, da die CY5-Oligonukleotide durch ihre kleine Größe auch bereits aus der teilweise hydrolysierten Kapselhülle austreten können.

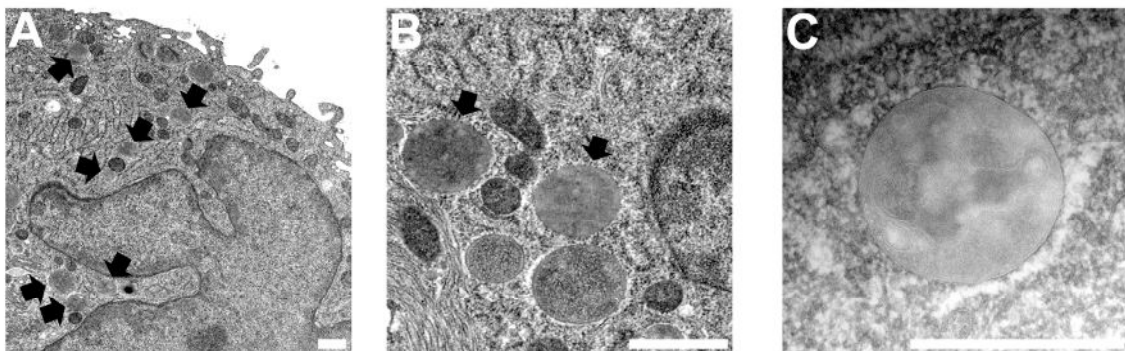


Abbildung 38: TEM-Bilder von intrazellulären PBCA-SDS-Kapseln in MSC nach 20 h Inkubation. Die Kapseln sind durch schwarze Pfeile angezeigt. Der Größenbalken entspricht 300 nm. Aufnahmen entstanden zusammen mit Dr. Martin Dass.

6.2.6 Kolokalisation von CY5-Oligonukleotiden in der Zelle untersucht im CLSM

Nachdem die Strukturen, mit denen die CY5-markierten Oligonukleotide aus den PBCA-Kapseln interagieren, noch nicht geklärt werden konnten, war es nötig, Kolokalisationsstudien durchzuführen. Deshalb wurden intrazelluläre Strukturen, die in Frage kommen, gefärbt. Es wurden Mitochondrien (Abbildung 39 D), das Tubulinskelett (Abbildung 39 H) und das Endoplasmatische Retikulum (Abbildung 39 L) von MSC gefärbt und die Kolokalisation mit den von CY5-Oligonukleotiden gefärbten Kompartimenten bestimmt (Abbildung 39 A, E, I). Quantitativ wurde eine Kolokalisation von 99,25% (Kolokalisation Rate R_{col} ; siehe auch 5.2.3) der faserige-ähnlichen Strukturen, die von den CY5-Oligonukleotiden gefärbt werden, mit den Mitochondrien bestimmt (vergleiche Abbildung 39 C und D). Es sind auch noch intakte Kapseln vorhanden, die als rote Punkte wegen der hohen lokalen Farbstoffkonzentration zu sehen sind (siehe überlagertes Bild Abbildung 39 A). An der gelben Farbe ist deutlich die Kolokalisation von Mitochondrien und den CY5-Oligonukleotiden zu erkennen (Überlagerung von Rot und Grün). Mit Tubulin (Abbildung 39 H) ergab sich nur eine 46,5%-ige und mit dem Endoplasmatischen Retikulum nur eine 40,22%-ige (Abbildung 39 L) Übereinstimmung. Aufgrund der Ergebnisse, die optisch und quantitativ erreicht wurden, ist von einer Kolokalisation der CY5-gelabelten Oligonukleotiden mit den Mitochondrien der Zelle auszugehen.

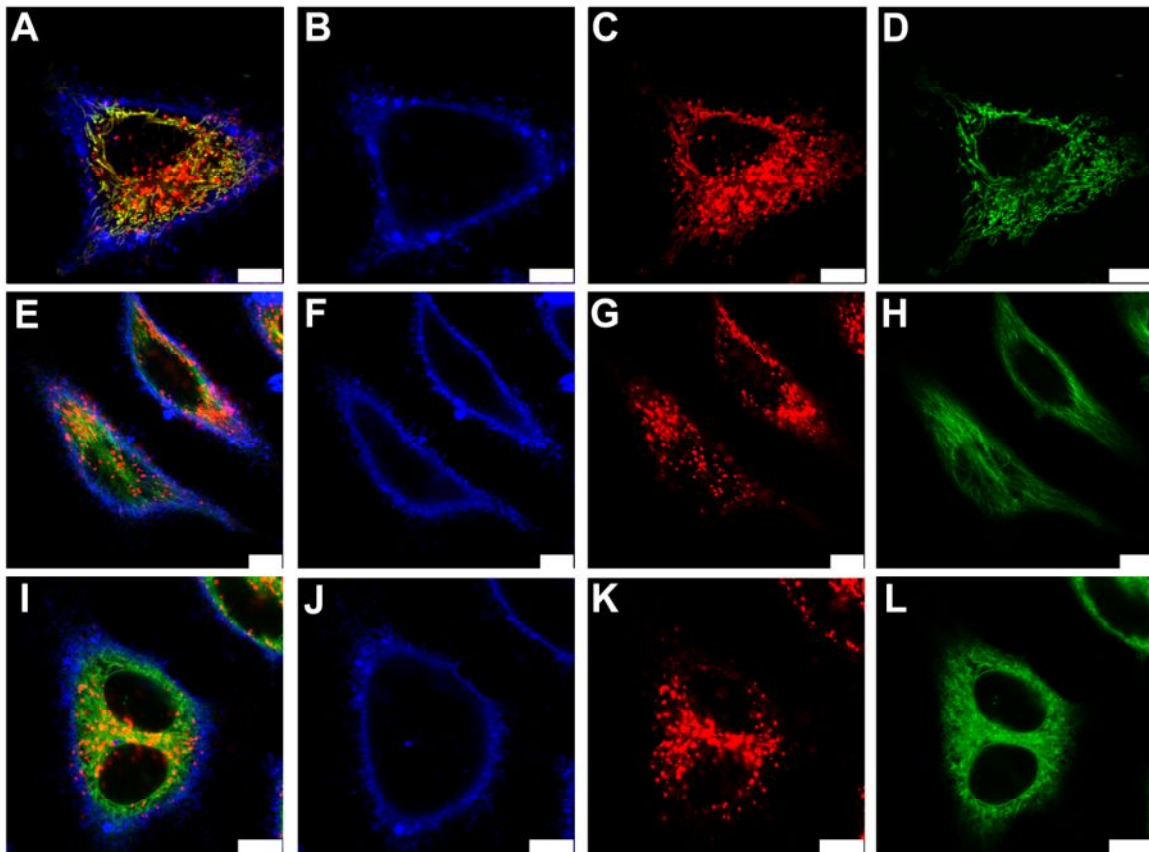


Abbildung 39: Kolokalisationsstudie mit PBCA-SDS-Kapseln im CLSM. A-D zeigt die Kolokalisation mit Mitochondrien, E-H die Kolokalisation mit Tubulin und I-L die Kolokalisation mit dem Endoplasmatischen Retikulum. A, E und I zeigen die überlagerten Bilder. B, F und J illustrieren in Blau die Färbung der Zellmembran mit CellMask™ Orange. C, G und K zeigen die PBCA-Kapseln und die durch sie gefärbten Strukturen in Rot. In D ist die Mitochondrienfärbung mit MitoTracker® Green FM, in H die Tubulinfärbung mit TubulinTracker™ Green und in L die Färbung des Endoplasmatischen Retikulums mit ER-Tracker™ Green in Grün zusehen. Kolokalisation ist durch Überlagerung von Grün und Rot in Gelb zu sehen. Größenbalken: 10 µm.

Da die Mitochondrien-bindende Eigenschaft von CY5-Oligonukleotiden zur Zeit der Experimentdurchführung noch unbekannt war, wurden diesbezüglich weitere Untersuchungen angestellt.

Als erstes wurden die Sequenz und die Länge der Oligonukleotide variiert (Abbildung 40). Die verwendeten Sequenzen sind unter 5.1.5 aufgeführt. Oligonukleotide mit der gleichen Länge, aber variiertes Sequenz ergaben die gleiche Färbung der Mitochondrien, die mit der original Sequenz beobachtet wurden (Abbildung 40 A). Wurde die Länge von 20 bp auf 40, 60 und 80 bp erhöht, erhielt man ebenfalls die gleiche Färbung der Mitochondrien in MSC (Abbildung 40 B-D). Ein Einfluss der Sequenz und der Länge der Oligonukleotiden konnte nicht festgestellt werden und scheint die Kolokalisation nicht zu beeinträchtigen.

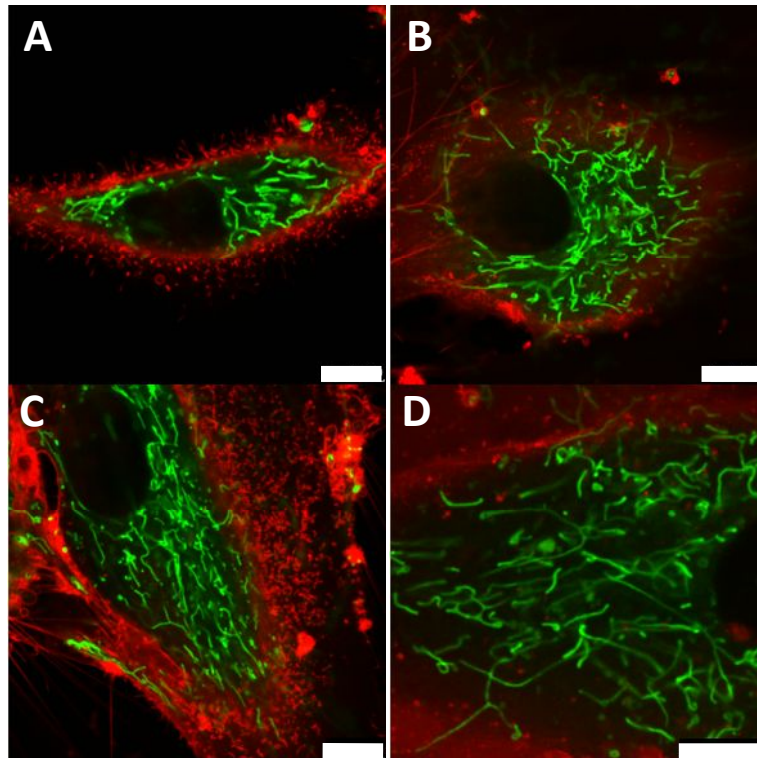


Abbildung 40: Variation der CY5-gelabelten Oligonukleotide für die Zugabe zu MSC nach 20 h Inkubation. Die CLSM-Aufnahmen zeigen die Strukturfärbung der Oligonukleotide in Grün, die Zellwand (CellMask™ Orange) in Rot. A) Oligonukleotide mit variiertes Sequenz 20 bp Länge, B) Sequenz mit 40 bp, C) Sequenz mit 60 bp und D) Sequenz mit 80 bp. Größenbalken: 10 µm.

Wurde allerdings der Fluoreszenzmarker CY5 gegen Texas-Red ausgetauscht, war keine Bindung der Oligonukleotide mehr zu beobachten. Sie lagen nur diffus in der Zelle verteilt vor (Abbildung 41 A). Deshalb wurde CY5-Ester zu den Zellen gegeben. CY5-Ester wurde nicht in Zellen aufgenommen. Mit Hilfe eines Transfektionsagens (NanoJuice®) wurde die Aufnahme in die Zelle erzwungen. Der so in die Zelle gelangte CY5-Ester fand sich aber ebenso verteilt in der Zelle vor wie die Texas-Red markierten Oligonukleotide (Abbildung 41 B). Er bleibt offenbar in Endosomen eingeschlossen. Somit ist klar, dass nur die Kombination von CY5 mit Oligonukleotid, unabhängig von dessen Länge oder Sequenz, eine Färbung der Mitochondrien durch eine noch ungeklärte Interaktion bedingt.

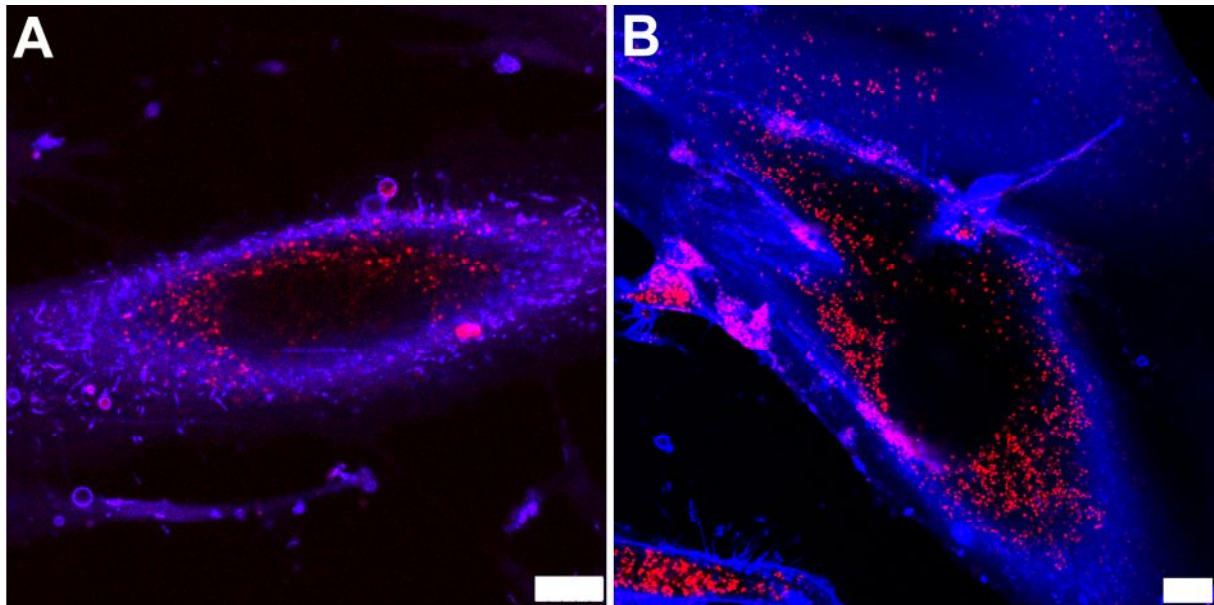


Abbildung 41: CLSM-Aufnahmen von MSC. A) zeigt eine MSC 20 h nach Inkubation mit einem Texas-Red markierten Oligonukleotid (rot). In B) ist eine MSC zu sehen, die mit CY5-Ester (rot) und Transfektionsagenz inkubiert wurde. Die Zellmembran wurde mit CellMask™ Orange gefärbt und ist blau dargestellt. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

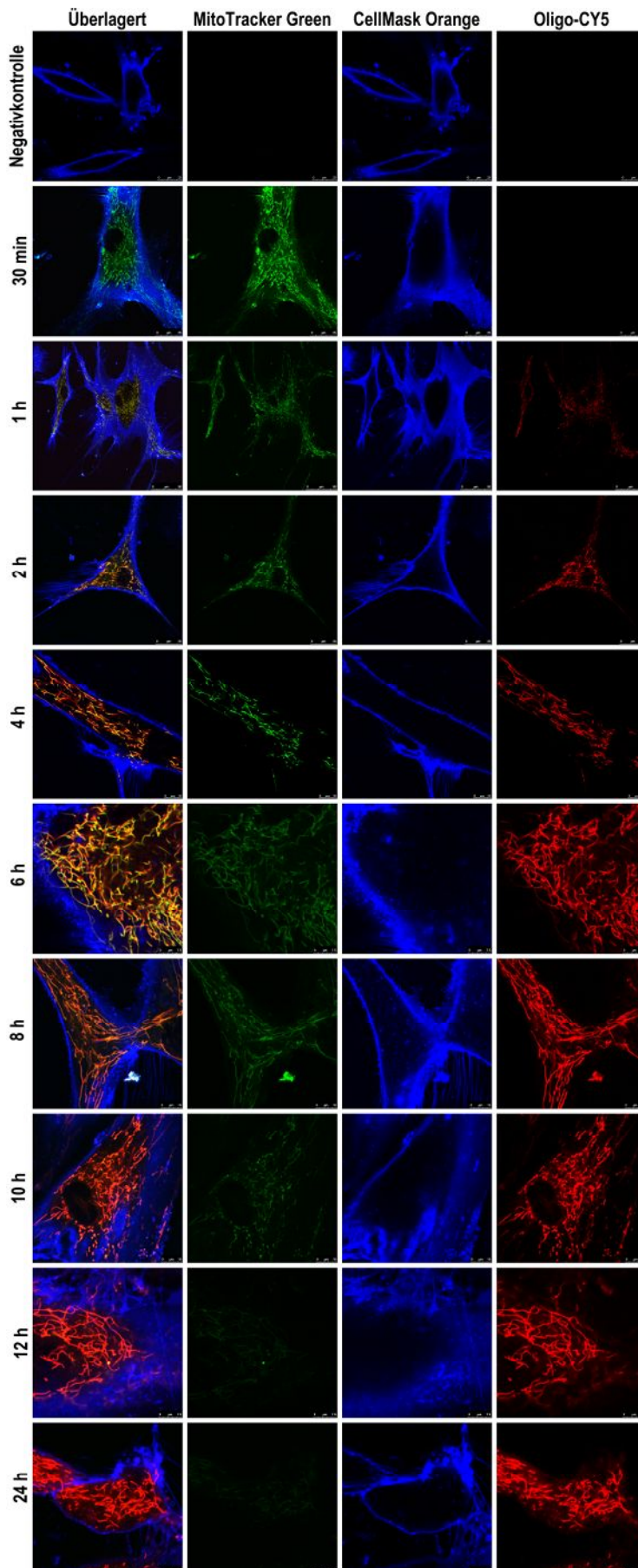


Abbildung 42: Zeitlicher Verlauf einer Mitochondrienfärbung im CLSM. MSC wurden vorab 15 min mit MitoTracker® Green gefärbt und CY5-Oligonukleotid gefärbt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und nur noch mit CY5-Oligonukleotid im Medium inkubiert. Gezeigt ist immer das überlagerte Bild und die einzelnen Kanäle getrennt über einen Zeitraum von 24 h im Vergleich zur nur CellMask™ Orange gefärbten Negativkontrolle.

Vergleichend wurde deshalb noch eine Studie durchgeführt, wie CY5-Oligonukleotide in der Fluoreszenzmikroskopie als Mitochondrien-Farbstoff dienen können. Dazu wurden MSC parallel mit Mitotracker® Green und CY5-Oligonukleotiden gefärbt. Während die Färbung mit Mitotracker® Green nach Protokoll nur ca. 15 min dauern soll, damit keine unspezifischen Signale entstehen, und nur in Puffer-Lösungen durchgeführt werden kann, da Medium die Reaktion blockt, kann CY5-Oligonukleotid im Gegensatz dazu im Medium dauerhaft vorhanden sein und eine dauerhafte Nachfärbung bewirken. In Abbildung 42 ist der Zeitverlauf der Färbung mit genannten Kriterien zu sehen. Während Mitotracker® Green sofort eine intensive Färbung der Mitochondrien liefert, die über die Zeit von 24 h stark abnimmt, färben die CY5-Oligonukleotide die Mitochondrien erst nach 1-2 h intensiv, bleiben aber von der Färbung durch ständige Verfügbarkeit erhalten, ohne unspezifisch zu werden. Somit sind CY5-Oligonukleotide der ideale Langzeitfärber von Mitochondrien ohne negative Einflüsse auf die Zellen, während Mitotracker® sich eher für schnelle Kurzzeitfärbungen eignet, auch wenn Mitotracker® weder in der Literatur noch hier toxische Effekte zeigte^[156].

Die Untersuchungen zur Kollokalisierung haben gezeigt, dass sich CY5-Oligonukleotide hervorragend zur Langzeitfärbung von Mitochondrien eignen. Sie zeigen eine hohe Kollokalisierung mit diesen. Oligonukleotide mit anderen Fluoreszenzmarkierungen zeigten kein derartiges Phänomen. Auch CY5-Ester ist nicht in der Lage, die Mitochondrien zu färben. CY5-Ester hat aber ohnehin die Eigenschaft, dass es nicht von der Zelle aufgenommen wird. Erst ein Transfektionsagens ermöglicht dies. Die Kombination aus CY5 und Oligonukleotid hingegen gelangt in die Zelle, was dem Oligonukleotid-Teil zuzuschreiben ist und interagiert mit den Mitochondrien. Die Interaktion ist abhängig vom CY5, da sie bei anderen Farbstoffen nicht auftritt. Aber nur in Kombination mit Oligonukleotiden ist sie offenbar möglich. CY5 ist ein Cyanin-Farbstoff aus der Gruppe der Polymethin-Farbstoffe. Diese wurden bereits Ende der 70er Jahre als zelluläre Farbstoffe und speziell als Mitochondrien-Interaktoren und Farbstoffe vorgestellt^[157-158]. Auch Patente der Firma Molecular Probes sind darauf verzeichnet^[159], so dass die Vermutung nahe liegt, dass der Farbstoff Mitotracker® auf dieser Basis hergestellt wird. Im Februar 2010 wurde eine Arbeit von Rhee et al. veröffentlicht, die auch diese Interaktion von DNA und RNA-Beacons mit Cyanin-Farbstoff-Markierung beschreibt^[160]. Sie beschreibt, dass die Bindung auf das Membranpotential der

Mitochondrien zurückzuführen ist und mit anderen Fluoreszenzmarkierungen (Alexa) nicht auftritt. Somit wurden alle gezeigten Ergebnisse unabhängig bestätigt. Auch gibt es Veröffentlichungen, die angeben, bestimmte, gezielt CY5-gelabelte mRNA-Sequenzen an Mitochondrien zu detektieren^[161]. Der Vorteil der in dieser Arbeit beschriebenen Methode ist die einfachere Zugabe und die schneller erreichte intensivere Färbung der Mitochondrien. Außerdem stellt die Nutzung von CY5-Oligonukleotiden eine elegante Möglichkeit dar, die Freisetzung aus Nanokapseln in der Zelle zu zeigen.

6.3 Funktionalisierung von Titanoberflächen mit Nanopartikeln für Hartgewebeimplantate

Dieser Teil der Arbeit hat das Ziel, Beschichtung von Titanoberflächen mit Nanopartikeln zu untersuchen, ob sie in Zellkultur stabil und geeignet sind für das Zellwachstum sind. Der Abschnitt zeigt die Ergebnisse, die im Projekt der Landesstiftung Baden Württemberg gewonnen wurden (Projektschreibung siehe auch 3.5). Dazu wurden verschiedene Phosphonat-Gruppen funktionalisierte Nanopartikel auf Titanoberflächen getestet, da Phosphonat-Gruppen eine feste Bindung an Titanoberflächen^[105, 162] ermöglichen. Da nie ausgeschlossen werden kann, dass Partikel von einer Oberfläche abgelöst werden, muss die Verträglichkeit der Partikel nach einer Zellaufnahme genauestens überprüft werden. Des Weiteren sollen gezielt aus diesen Partikeln der Oberflächenbeschichtung Wirkstoffe freigesetzt werden, die z.B. das Wachstum, die Aktivität und das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen können. In diesem Kapitel werden die grundlegenden Arbeiten sowie die ersten Oberflächenbeschichtungen in der Untersuchung mit MSC vorgestellt.

Im ersten Teil (6.3.1) wurden Partikel mit unterschiedlicher Phosphonatgruppen-Anzahl und Funktionalisierung auf der Oberfläche auf Ihre Zell-Aufnahme und Verträglichkeit getestet. Dazu wurden phosphonat-funktionalisierte Polystyrol-Nanopartikel (VPS-Partikel) (Abbildung 43) (synthetisiert von Anke Zeller) verwendet, deren Synthese in *Ziegler et al.*^[52] beschrieben ist und deren wichtigste Eigenschaften in Tabelle 5 zu sehen sind. Die Partikel unterscheiden sich in der Anzahl an Phosphonat-Gruppen auf der Oberfläche. Die Stabilisierung der Partikel erfolgte durch Lutensol® AT50.

Tabelle 5: Eigenschaften der VPS-Partikel (D_z = mittlere Partikelgröße, PDI= Polydispersitätsindex)

Menge des Comonomers VPS in wt%	D_z [nm]	PDI	Zeta Potential [mV]	Menge an $-\text{PO}_3\text{H}_2$ Gruppen pro nm^2
-	208	0,03	-2,2	0
1	247	0,03	-7,7	0,10
3	252	0,05	-20,4	0,19
5	228	0,06	-16,7	0,25
10	210	0,09	-18,5	0,42

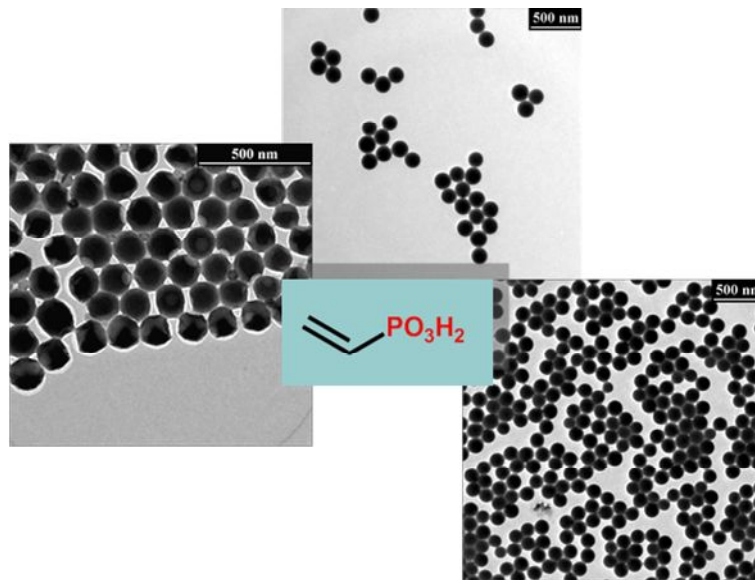


Abbildung 43: Phosphonat-funktionalisierte Polystyrolnanopartikel (VPS-Partikel) synthetisiert von Anke Zeller. Gezeigt sind TEM-Aufnahmen der Partikel und die Formel der verwendeten Vinylphosphonsäure. (Bilder angefertigt von Anke Zeller).

Auch Vinylbenzylphosphonsäure wurde zur Funktionalisierung der Partikeloberfläche verwendet (Tabelle 6). Diese Partikel (VBPS-Partikel) wurden ebenfalls von Anke Zeller hergestellt (Abbildung 44). Die Funktionalisierung mit Vinylbenzylphosphonsäure hat den Vorteil, noch mehr funktionelle Phosphonatgruppen auf die Partikeloberfläche zu bringen (annähernd doppelt so viele wie bei den VPS-Partikel mit 10% Comonomeren in Tabelle 5). Dies ermöglicht eine noch bessere Bindung an Titanoberflächen. Die VBPS-Partikel wurden auf Aufnahme und Toxizität in MSC getestet.

Tabelle 6: Eigenschaften der VBPS-Partikel (D_z = mittlere Partikelgröße, PDI= Polydispersitätsindex)

Menge des Comonomers VBPS in wt%	D_z [nm]	PDI	Zeta Potential [mV]	Menge an $-\text{PO}_3\text{H}_2$ Gruppen pro nm^2
5	233	0,10	-31	0,75

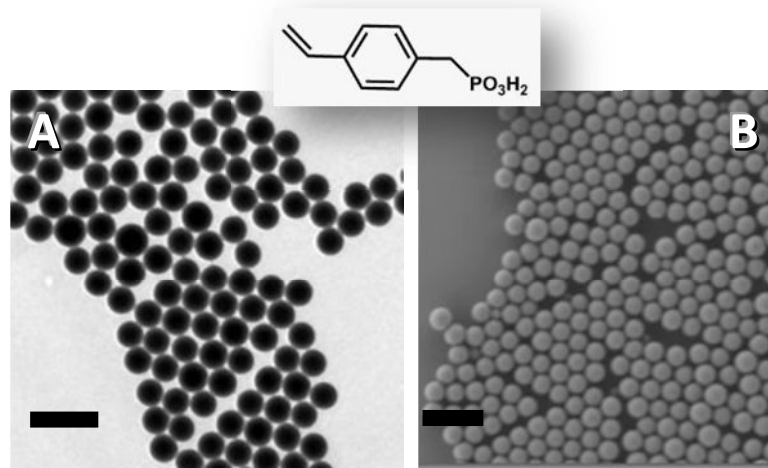


Abbildung 44: VBPS-Partikel dargestellt im TEM (A) und REM (B). Außerdem ist die Formel von Vinybenzylphosphonsäure zu sehen. Abbildungen von Anke Zeller. Größenbalken: 500 nm.

Im zweiten Teil (6.3.2) wurden VPS-Nanopartikel (10%-Comonomer VPS) zu MSC gegeben und deren Differenzierungspotential untersucht. Eine Beeinflussung der Differenzierung der Zellen durch reine Partikel ist nicht erwünscht, sondern soll später ausschließlich gezielt durch Wirkstofffreisetzung erreicht werden. Da, wie bereits erwähnt, sich Nanopartikel von Implantat-Beschichtungen ablösen können, ist es nötig, die Auswirkungen einer Zellaufnahme der Partikel zu untersuchen.

Im dritten Teil (6.3.3) wurde eine zusätzliche Hydroxylapatit-Funktionalisierung der Partikel getestet. Hydroxylapatit soll die Biokompatibilität der Oberfläche der Partikel und später der Beschichtungen erhöhen. Hydroxylapatit wird natürlicherweise beim Knochenaufbau gebildet und dient bei den Oberflächen später als Grundlage für die weitere Kalzifizierung durch die Osteoblasten (knochenaufbauende Zellen). Zunächst wurde die Aufnahme und Toxizität dieser Partikel untersucht. Als Grundlage für diese Partikel dienten die in Tabelle 6 vorgestellten VBPS-Partikel, die von Kathrin Schöller mit Hydroxylapatit (HAP) beladen wurden (siehe auch 3.5). Die Beladung der Partikel mit HAP wurde mit 30% der Gesamtmasse der Partikel berechnet.

Im vierten Teil (6.3.4) wurden erste Modell-Titanoxidoberflächen, beschichtet mit VBPS-Partikeln (siehe Tabelle 6), auf das Zellwachstum getestet. Dazu wurden mit Titan bespatterte Silizium-Wafer von Anke Zeller und Kilian Schuller mit VBPS-Partikel beschichtet. Die Wahl auf VBPS-Partikel fiel aufgrund der hohen Dichte an Phosphonat-Gruppen auf der

Partikeloberfläche, die eine noch bessere Bindung an Titanoxid ermöglichen.

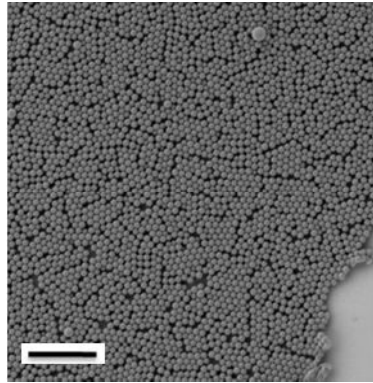


Abbildung 45: Titanoxidoberfläche mit VBPS-Partikeln beschichtet. REM-Aufnahme von Anke Zeller. Größenbalken: 2 µm.

Im fünften und letzten Teil (6.3.5) wurden verschiedene Partikel und Kapseln zur Wirkstofffreisetzung getestet. Zum einen wurden Polyurethan-Nanokapseln aus Hexandiol und Polyharnstoff-Nanokapseln aus Dimethylaminopentan, die Bisphosphonat enthalten, von Anke Zeller synthetisiert (siehe Tabelle 7). Die Herstellung erfolgte über eine Polyaddition an der Grenzfläche in der inversen Miniemulsion^[163-164]. Als Fluoreszenzfarbstoff in den Kapseln diente Sulforhodamin-101. Ziel von diesen Kapseln sollte es sein, das Bisphosphonat freizusetzen und somit die Aktivität von Osteoklasten zu hemmen (siehe auch 3.5), was für eine Beschleunigung des Einwachsens von Implantaten sorgen würde. Hierzu wurden für diese Arbeit Tests zur Aufnahme und Toxizität in MSC durchgeführt. Arbeiten mit Osteoklasten erfolgten durch Andrea Tautzenberger und waren bei Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen^[165]. Zum anderen wurden Polylaktid-Nanopartikel (PLA-Partikel) mit Dexamethason von Anke Zeller hergestellt (siehe Tabelle 7). Dexamethason ist ein Wirkstoff, der eine Differenzierung von MSC zu Osteoblasten bewirken kann (siehe auch 3.4) und so den Knochenaufbau fördert. Auch wurden Aufnahme- und Toxizitätstests in MSC im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Tests zur Differenzierung von MSC sollen von Kooperationspartnern durchgeführt werden und liegen zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht vor.

Tabelle 7: Kapseln und Partikel mit Wirkstoffbeladung von Anke Zeller. (D_z = mittlere Partikel-/Kapsel-Größe)

Name	Polymer	Monomer	D_z [nm]	System	Beladung/Verkapselung
HD-Null	Polyurethan	Hexandiol + TDI	300	Kapsel	-
HD-Bisphos.	Polyurethan	Hexandiol + TDI	320	Kapsel	Bisphosphonat
DMAP-Null	Polyharnstoff	Dimethylaminopentan + TDI	280	Kapsel	-
DMAP-Bisphos.	Polyharnstoff	Dimethylaminopentan + TDI	290	Kapsel	Bisphosphonat
PLA-Null	Polylactid	Lactid	134	Partikel	-
PLA-2%Dex	Polylactid	Lactid	178	Partikel	2 wt% Dexamethason
PLA-5%Dex	Polylactid	Lactid	223	Partikel	5 wt% Dexamethason

Neben der Eigenschaft von phosphonat-funktionalisierten Polystyrolnanoartikeln, leicht auf Titanoxid-Oberflächen zu binden und der Eigenschaft, die Oberfläche der Phosphonatgruppen weiter funktionalisieren zu können, z.B. mit Hydroxylapatitschichten, können sie auch mit noch weiteren Molekülen funktionalisiert werden^[162]. Deshalb könnten VPS-Nanopartikel interessant für weitere biologische Anwendungen wie Zellmarkierungen und Zell-Tracking sein.

6.3.1 Aufnahme und Toxizitätsstudien mit phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln

Verschiedene Polystyrol-Nanopartikel, die mit Phosphonatgruppen über Vinylphosphonsäure als Comonomer funktionalisiert wurden (siehe Tabelle 5), wurden zu HeLa-Zellen (75 µg/mL) gegeben und 18 h inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme und Toxizität der Partikel im FACS bestimmt.

Im FACS war eine Aufnahme (Abbildung 46 A) der Partikel in die Zellen zu erkennen, die bei den VPS-Partikeln mit 10% Comonomer am höchsten ausfiel. Unfunktionalisierte Polystyrolnanopartikel (PS-Partikel) wurden nur schlecht in die Zellen aufgenommen, was aus früheren Untersuchungen bekannt ist^[51]. Partikel mit 1% VPS wurden etwas besser als unfunktionalisierte Partikel aufgenommen, Partikel mit 3% VPS und 5% VPS schlechter. Warum eine Funktionalisierung mit 3% und 5% VPS zu einer schlechteren Aufnahme führt, 10% VPS-Partikel aber wesentlich besser aufgenommen wurden, ist leider nicht geklärt. Das Ergebnis war aber mehrmals reproduzierbar. Die intrazelluläre Lokalisation wurde im CLSM bestätigt.

Die Toxizität der Partikel wurde ebenfalls im FACS mit 7-AAD-Färbung überprüft (Abbildung

46 B). Die Partikel waren nicht toxisch. So zeigt sich kein Unterschied der Toxizität der VPS-Partikelproben zur PS-Partikelprobe. In allen Proben sind, wie in der Negativkontrolle, stets 90% der Zellen lebendig.

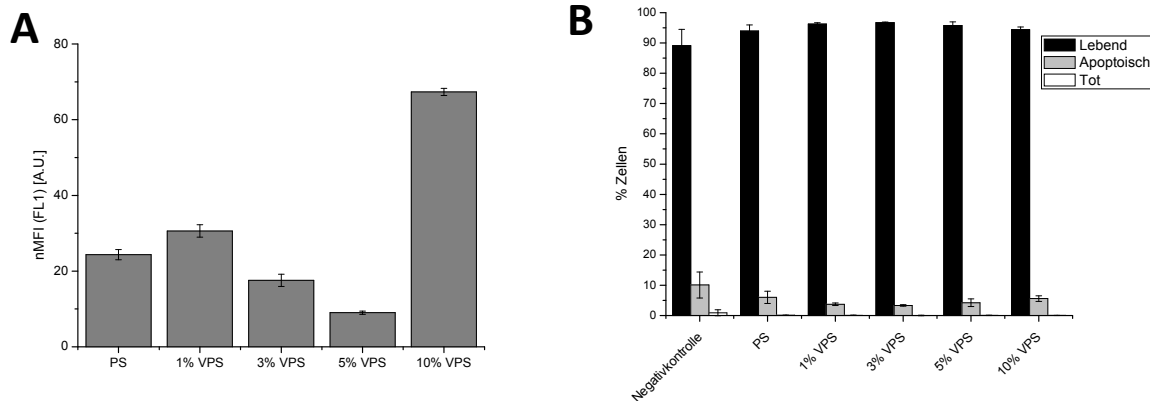


Abbildung 46: FACS-Analyse der VPS-Partikel (1%-10%) im Vergleich zum unfunktionalisierten Polystyrol-Partikel (PS-Partikel). A) Aufnahme der Partikel in HeLa-Zellen. Werte normiert nach PMI-Gehalt. B) Toxizität der Partikel in HeLa-Zellen mit 7-AAD verglichen zur Negativ-Kontrolle.

Zum Vergleich wurden Polystyrol-Nanopartikel, die eine Phosphonatfunktionalisierung über Vinylbenzylphosphonsäure (VBPS-Partikel) tragen, in Zellkultur mit MSC getestet. Die Aufnahme und Toxizität wurde im FACS untersucht.

Es zeigte sich, dass die Partikel in MSC aufgenommen wurden (Abbildung 47 A). Die intrazelluläre Aufnahme wurde im CLSM bestätigt (Abbildung 48). Dabei zeigte sich, dass die verwendeten VBPS-Partikel im Zellmedium zur Aggregation neigen. In Abbildung 48 B sind deutlich extra- und intrazelluläre Partikelaggregate zu erkennen. Diese scheinen eine Aufnahme aber nicht auszuschließen.

Eine Toxizität der Partikel im FACS nach einer 7-AAD-Färbung der Zellen war nicht zu erkennen. Die Zellen, die 18 h mit den VBPS-Partikeln inkubiert waren, zeigen ebenso wenig tote Zellen wie die Negativkontrolle ohne Partikel.

VBPS-Partikel sind trotz Aggregationsneigung für Zelleexperimente geeignet. Die Aggregation der Partikel könnte auf die hohe Oberflächengruppenbeladung der Partikel zurückzuführen sein. Diese bewirkt eine sehr hohe negative Ladung der Partikel, die zu Interaktionen mit Proteinen des Zellmediums führen kann.

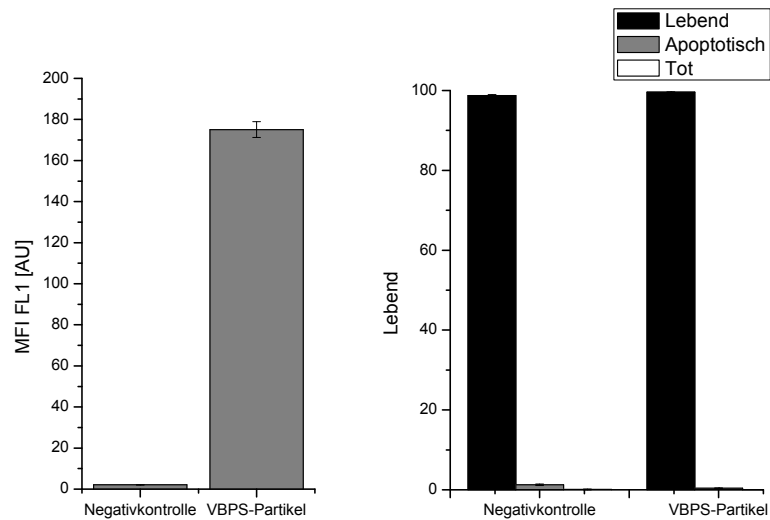


Abbildung 47: FACS-Analyse der 5%VBPS-Partikel nach 18 h Inkubation mit MSC (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A) Aufnahme im FACS verglichen mit der Negativ-Kontrolle. B) Toxizitätstest mit 7-AAD. MSC mit VBPS-Partikel verglichen mit der Negativkontrolle.

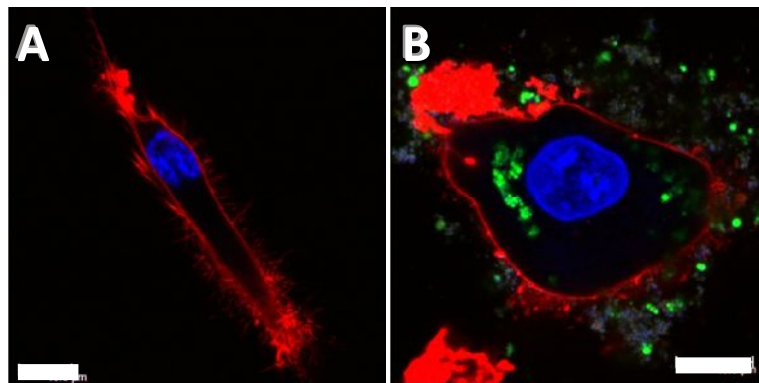


Abbildung 48: CLSM-Aufnahmen von MSC. A) Negativkontrolle ohne Partikel, B) mit VBPS-Partikeln (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 18 h Inkubation). Die Zellwand ist rot dargestellt (CellMask™ Orange), der Zellkern blau (DRAQ™5), die Partikel grün (PMI). Größenbalken: 10 μm .

Aufgrund der guten Aufnahme der 10%-VPS-Partikel in die Zellen, wurden diese für die Differenzierungsversuche mit MSC im nächsten Abschnitt (6.3.2) ausgewählt. So konnte bei hoher Partikelbeladung der Zellen der Einfluss auf das Differenzierungspotential von Partikeln mit hoher Phosphonatgruppenfunktionalisierung untersucht werden.

6.3.2 Differenzierungsstudien mit Phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln in MSC^[166]

Für Differenzierungsstudien mit MSC wurden wie oben erwähnt, die Polystyrolnanopartikel mit 10% VPS (im Folgenden als VPS-Partikel bezeichnet) ausgewählt. In einigen Veröffentlichungen ist bereits beschrieben worden, dass Nanopartikel zu keiner Beeinflussung des Differenzierungspotentials von MSC führen^[167-169]. Diese Studien bezogen sich aber auf Quantum Dots oder Silica-Partikel. Andere Studien zeigten eine Beeinflussung des Differenzierungspotentials durch auf Kalziumphosphat basierenden Nanopartikel^[170-171]. Nur in einem Fall wurden osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung untersucht^[167]. Eine umfassende, qualitative Studie insbesondere mit phosphonat-funktionalisierten Nanopartikeln ist bisher nicht durchgeführt worden.

Zunächst wurde die Aufnahme und der Verbleib der Partikel in MSC quantitativ im FACS am Tag 5 (Abbildung 49 A) und Tag 16 (Abbildung 49 B) nach der Zugabe der Partikel analysiert. Viele Partikel zeigen eine Assoziation mit den MSC und den differenzierten Linien am Tag 5 des Experiments nach Partikelzugabe (Abbildung 49 A). Ebenso wie für aminofunktionalisierte Nanopartikel zeigt sich bei den VPS-Nanopartikeln eine erhöhte Zellaufnahme bedingt durch die Oberflächenladung der Partikel^[50]. Spontane Partikel Aufnahme in Zellen wurden bereits für viele andere Partikel beschrieben^[50, 63, 172]. Allgemein werden Nanopartikel durch verschiedene Mechanismen aufgenommen^[173]. Für Nanopartikel von einigen hundert Nanometern sind endozytische Wege wie Makropinozytose oder die Clathrin-vermittelte Aufnahme beteiligt. Besonders die Makropinozytose scheint bei der Aufnahme von geladenen Nanopartikeln eine wichtige Rolle zu spielen^[63]. Die genauen Aufnahmewege wurden in dieser Studie allerdings nicht näher untersucht. Auch am Tag 16 sind immer noch eine große Zahl von Partikeln mit den MSC und den adipogen differenzierten Zellen assoziiert (Abbildung 49 B). Die Anzahl der Partikel in der osteogenen Linie ist im Vergleich zu den anderen Linien stärker reduziert. Dies kann durch eine stärkere Proliferation der osteogenen Linie bedingt sein. Deshalb kommt es zu einer Partikelverteilung auf viele Tochterzellen und somit zu einer geringeren Beladung pro Zelle im Median. Bisherige Studien haben sich auf eine kürzere Zeitperiode beschränkt^[50-51, 169]. Die Anzahl der partikelpositiven Zellen, bzw. der im Fluoreszenzkanal FL1 positiven Zellen

betrug stets mehr als 98% (Abbildung 50).

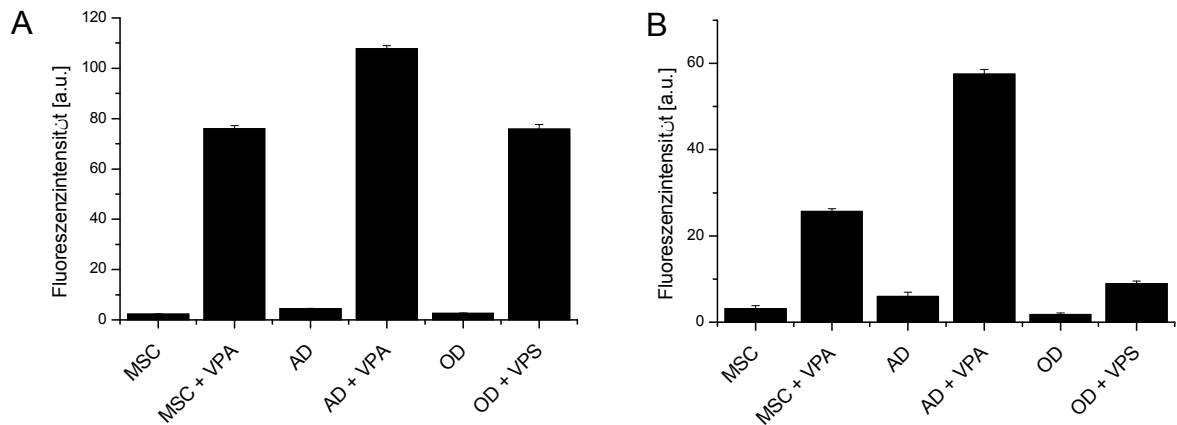


Abbildung 49: Durchflusszytometrische Analyse der VPS-Partikel-Assoziation mit undifferenzierten MSC und Zellen, differenziert in die Adipogene (AD) und Osteogene (OD) Linie nach 5 Tagen und 16 Tagen des Experiments, verglichen mit Zellen ohne Partikel. Median-Fluoreszenz-Intensität mit Standardabweichung eines Experiments in Duplikaten.

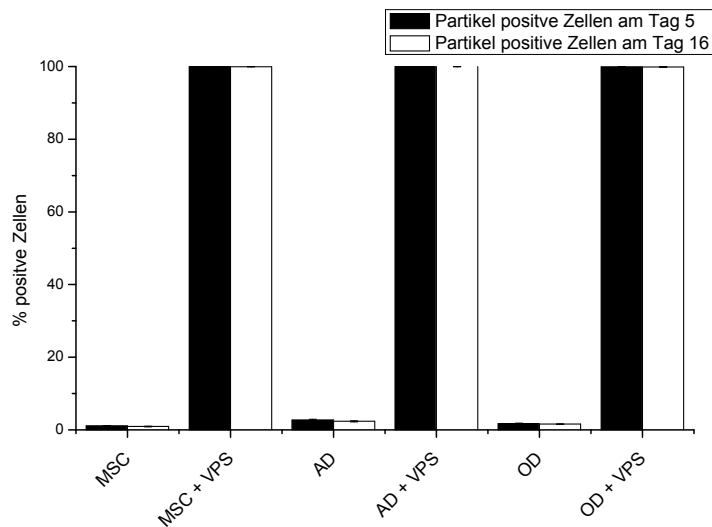


Abbildung 50: Partikelpositive Zellen in der FACS-Analyse. Angaben in Prozent der gesamt analysierten Zellen. Verglichen wird jeweils Tag 5 und Tag 16 des Experiments. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Standardabweichung in Duplikaten.

Obwohl die Durchflusszytometrie quantitativ die Assoziation der Partikel mit den Zellen bestätigen konnte, kann sie jedoch keinerlei Aussage über die Lokalisation der Partikel geben. So wäre man nicht in der Lage, zwischen an die Zelle angelagerten und aufgenommenen Partikeln zu unterscheiden. Um die intrazelluläre Lokalisation der Partikel zu bestätigen und näher zu betrachten, wurde eine CLSM-Analyse nach 5 und 16 Tagen Kultivierung der Zellen nach Partikelzugabe durchgeführt. Die Zellmembran der Zellen wurde dazu mit CellMask™ Orange angefärbt, um zwischen intrazellulär und extrazellulär liegenden Partikeln

unterscheiden zu können. Die Partikel sind durch den Fluoreszenzfarbstoff PMI grün zu erkennen. Die Partikel Aufnahme wurde am Tag 5 (Abbildung 51 A-C) und Tag 23 (Abbildung 51 D-G) bei MSC und der osteogenen und adipogenen Differenzierung untersucht. Die Untersuchung auf Partikel im chondrogenen Pellet erfolgte am Tag 36 (Abbildung 51 H und I). Eine große Anzahl Partikel sind am Tag 5 in den undifferenzierten MSC zu erkennen (Abbildung 51 A), ebenso aber auch in den osteogen- (Abbildung 51 B) und adipogen- (Abbildung 51 C) differenzierten Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen im FACS. Somit ist der gemessene Median-Fluoreszenzwert im FACS mit der Aufnahme der Partikel gleichzusetzen. Die beobachteten Partikel sind um den Zellkern lokalisiert. Nach 23 Tagen sind immer noch viele Partikel in undifferenzierten MSC (Abbildung 51 D) und in osteogen (Abbildung 51 E) und adipogen (Abbildung 51 F) differenzierten Zellen zu sehen, was sich mit dem im FACS erhaltenen Partikelmengenanalysen in Zellen deckt. Bei den osteogen differenzierten Zellen sind bereits typische Mehrschicht-Strukturen zu erkennen (Abbildung 51 E), was die starke Proliferation dieser Differenzierungslinie bestätigt. In der adipogenen Linie kann man klar die typischen Fettvakuolen finden (Abbildung 51 G). In der chondrogenen Differenzierung am Tag 36 konnte keine Zellmembranfärbung durchgeführt werden, da die vorhandenen Pellets bereits zum Schneiden fixiert werden mussten und CellMask™ Orange das gesamte Pellet färben würde. Trotzdem konnte in dem Pellet eine große Anzahl an Partikeln detektiert werden (Abbildung 51 H und I), was die Differenzierung in Gegenwart von VPS-Partikeln beweist.

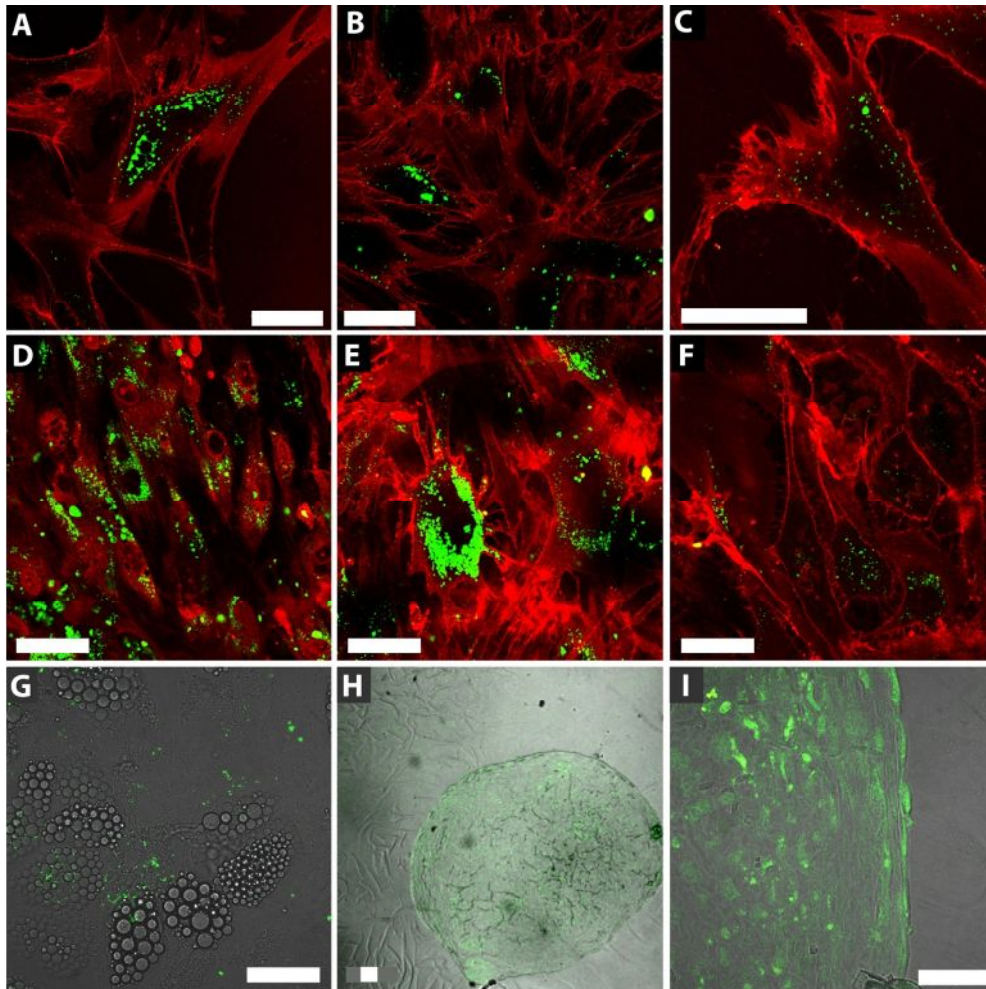


Abbildung 51: Intrazelluläre Lokalisation von VPS-Partikeln im CLSM. Die Partikel sind grün zu erkennen (PMI), die Zellwände sind rot gefärbt (CellMask™ Orange). Am Tag 5 wurden die Partikel hauptsächlich in Clustern im Inneren von undifferenzierten MSC und osteogen und adipogen differenzierten Linien gefunden (A-C). Auch nach 23 Tagen (D-F) Kultivierung sind in MSC, osteogen und adipogen differenzierten Zellen immer noch intrazelluläre Partikel erkennbar. Phasenkontrast-Bilder kombiniert mit Fluoreszenz zeigen die entstehenden Fettvakuolen nach 23 Tagen (G). In den Zellpellets der chondrogenen Differenzierung sind überall im Pellet Partikel zu erkennen (H und I). Größenbalken: 50 µm.

Um eine genauere Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der Partikel in den Zellen zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine TEM-Analyse durchgeführt. Am Tag 5 des Experiments sind sowohl in undifferenzierten MSC (Abbildung 52 A), als auch in der osteogenen (Abbildung 52 B) und adipogenen (Abbildung 52 C) Differenzierungslinie viele geclusterte Partikel in den Zellen zu erkennen. Dabei scheinen sich die Partikel dicht gepackt in zellulären Kompartimenten zu befinden, die durch Membranen vom Zytoplasma getrennt zu sein scheinen (Abbildung 52 A-C Pfeile). Membranhüllte Partikelcluster wurden bereits in

früheren Untersuchungen festgestellt^[51, 174]. Nach 23 Tagen des Experiments sind die Partikel noch immer in undifferenzierten MSC (A) und in der osteogenen (Abbildung 52 B) sowie der adipogenen (Abbildung 52 C) Differenzierungslinie zu finden (Abbildung 52 D-F). Die Partikel lagen noch immer in Clustern (Abbildung 52 D und E) vor, allerdings konnte nur teilweise eine umschließende Membran beobachtet werden (Abbildung 52 F). Da eine Erhaltung von Membranen in der verwendeten chemischen Fixation der Zellen nicht gewährleistet ist, kann es sich dabei um Präparationsartefakte handeln. Niemals wurden die Partikel im Zellkern, dem Golgi-Apparat oder den Mitochondrien gefunden.

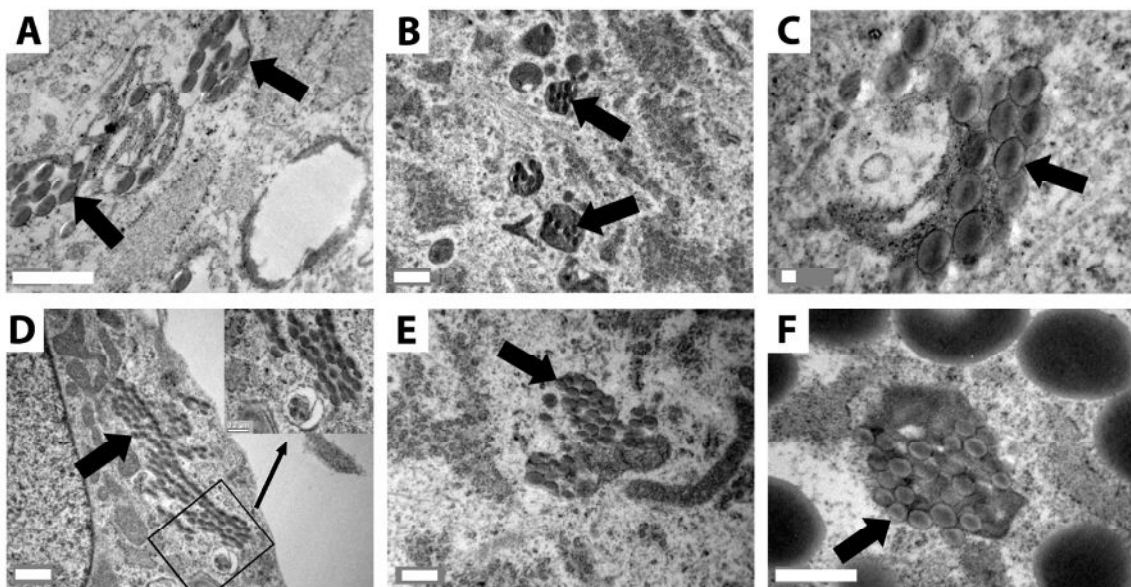


Abbildung 52: Intrazelluläre Lokalisation von VPS-Partikeln dargestellt im TEM. Die Zellen wurden chemisch fixiert. Am Tag 5 (A-C) befinden sich die Partikel in Clustern (Pfeile) in undifferenzierten (A), osteogen (B) und adipogen (C) differenzierten MSC. Die Partikel erscheinen dabei klar von einer Membran umgeben. Am Tag 23 (D-F) zeigt sich ein ähnliches Bild in undifferenzierten (D), osteogen (E) und adipogen (F) differenzierten MSC, allerdings sind Partikel umgebende Membranen nicht immer klar sichtbar. Größenbalken: 500 nm. Präparation von Herrn Schmied, Elektronenmikroskopie Ulm.

Nach Partikelzugabe wurde die Toxizität der Partikel auf undifferenzierte, osteogen und adipogen differenzierte MSC am Tag 5 (Abbildung 53 A) und Tag 16 (Abbildung 53 B) des Versuchs mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung im FACS überprüft. Dabei konnten sowohl am Tag 5 als auch am Tag 16 für undifferenzierte MSC, wie für die differenzierte Zellen über 85% lebende Zellen detektiert werden. Ein Einfluss der VPS-Partikel war nicht zu erkennen. Auch bei der Verwendung von Polystyrol-Nanopartikeln in HeLa-Zellen konnte schon früher kein Einfluss auf die Vitalität gezeigt werden^[50, 63]. Lediglich bei der osteogenen Linie war eine

leicht angestiegene Apoptose der Zellen am Tag 16 zu beobachten (Abbildung 53 B), die aber unabhängig von den VPS-Partikeln auftrat. Dies kann daher kommen, dass es bei den osteogen differenzierten Zellen zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix kommt, die ein Ablösen der Zellen für die FACS-Präparation schwierig macht und so eine intensivere Behandlung mit Trypsin erfordert. Dieser negative Einfluss des intensiveren Einsatzes von Trypsin ist bekannt. Die chondrogene Linie konnte leider nicht durchflusszytometrisch untersucht werden, da sich die Zellen, wie es für eine Analyse nötig ist, nicht aus dem Verband lösen ließen. Die Morphologie der Zellen und die Ergebnisse der RT-PCR und zytochemischen Färbung legen eine Unversehrtheit dieser Zellen auch in Anwesenheit von Partikeln nahe (Ergebnisse von Andrea Tautzenberger ^[166]).

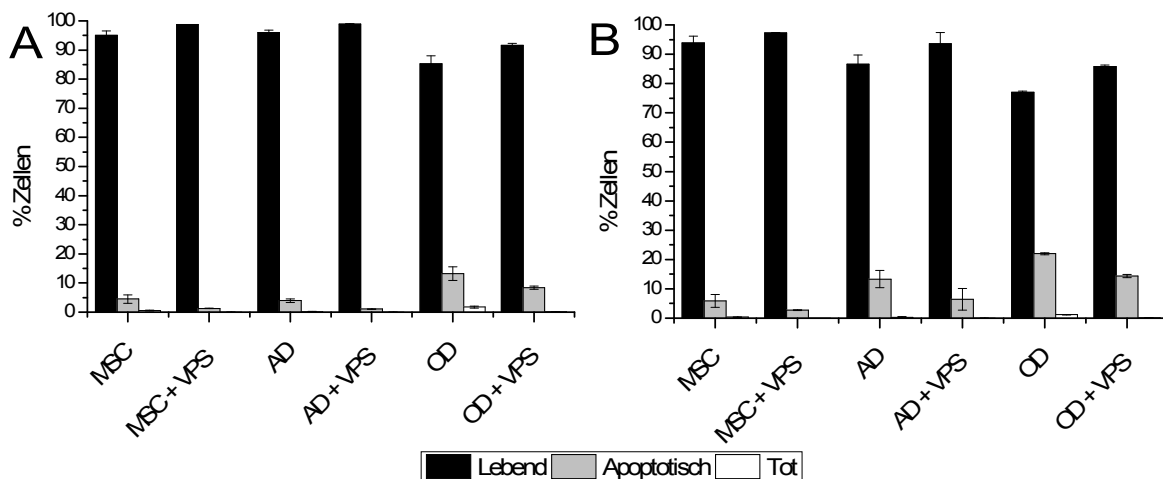


Abbildung 53: Prozent lebende, apoptotische und tote undifferenzierte MSC, Zellen der osteogenen (OD) und adipogenen (AD) Linien am Tag 5 (A) und 16 (B) mit und ohne VPS-Partikel. Bestimmung durch 7-AAD-Färbung im FACS. Gezeigt wird der Median-Wert mit Standardabweichung aus einem Experiment aus Triplikaten.

Die Differenzierungsversuche und Untersuchungen der MSC wurden von unseren Kooperationspartnern am Institut für Orthopädie und Biomechanik an der Universität Ulm bei Frau Professor Ignatius durchgeführt. Die gezeigten Daten wurden dort gewonnen und werden zur Vollständigkeit gezeigt. Die Analyse der Differenzierung erfolgte qualitativ und quantitativ. Die qualitative Untersuchung erfolgte durch histochemische Färbungen. Zur Bestätigung der osteogenen Differenzierung wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität (Abbildung 54 A) untersucht und die extrazelluläre Matrix mit einer von Kossa-Färbung (färbt Kalziumeinlagerungen schwarz) auf Mineralisation überprüft (Abbildung 54 B). In der

Ergebnisse und Diskussion

adipogenen Differenzierung wurden die Lipidvakuolen mit Ölrot angefärbt (Abbildung 54 C). In der chondrogenen Linie wurde die Differenzierung auf Proteoglycan mit Alcian-Blau Färbung (Abbildung 54 D) und Aggrecan immunohistochemisch (Abbildung 54 E) untersucht. Bei allen Färbungen wurden keine qualitativen und quantitativen Unterschiede in der Färbung zwischen Zellen mit und ohne Partikeln gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Partikeln keinerlei negative Auswirkung auf das Differenzierungspotential der MSC hat.

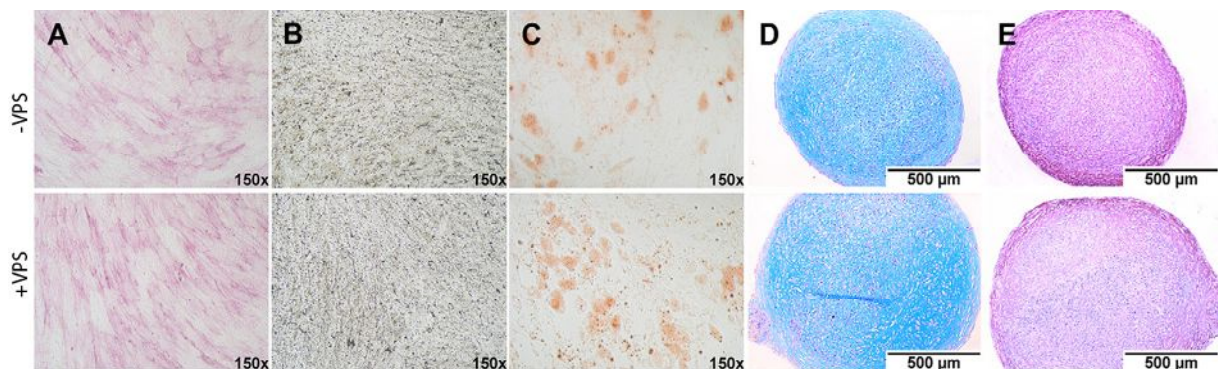


Abbildung 54: Die Differenzierung von MSC in der Gegenwart von VPS-Partikeln (unteres Panel) wurde qualitativ mit zytochemischen Methoden überprüft. MSC, die in der Abwesenheit von Partikeln differenziert wurden (unters Panel), dienten als Kontrolle. In der osteogenen Linie wurde die alkalischen Phosphatase Aktivität (A) und die Mineralisation mit einer von Kossa-Färbung (B) am Tag 23 untersucht. Die Ölrot-Färbung diente in der adipogenen Linie zum Färben der Lipidvakuolen (C) ebenfalls am Tag 23. Die chondrogene Linie wurde mittels Alcian-Blau-Färbung (D) und auf Aggrecan (E) am Tag 36 untersucht (Ergebnisse von Andrea Tautzenberger).

Diese Ergebnisse wurden mit der quantitativen RT-PCR bestätigt. In Zellen die in die osteogene Linie differenzierte wurden, wurden die Marker-Gene *Knochen Sialoprotein* (BSP), *alkalische Phosphatase* (AP), *Osteocalcin* (OC), *Osteopontin* (OP) und der Transkriptionsfaktor *Runx2* wie erwartet während der Kultivierungszeit stark hochreguliert (Abbildung 55 A). Es gab dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne VPS-Partikel.

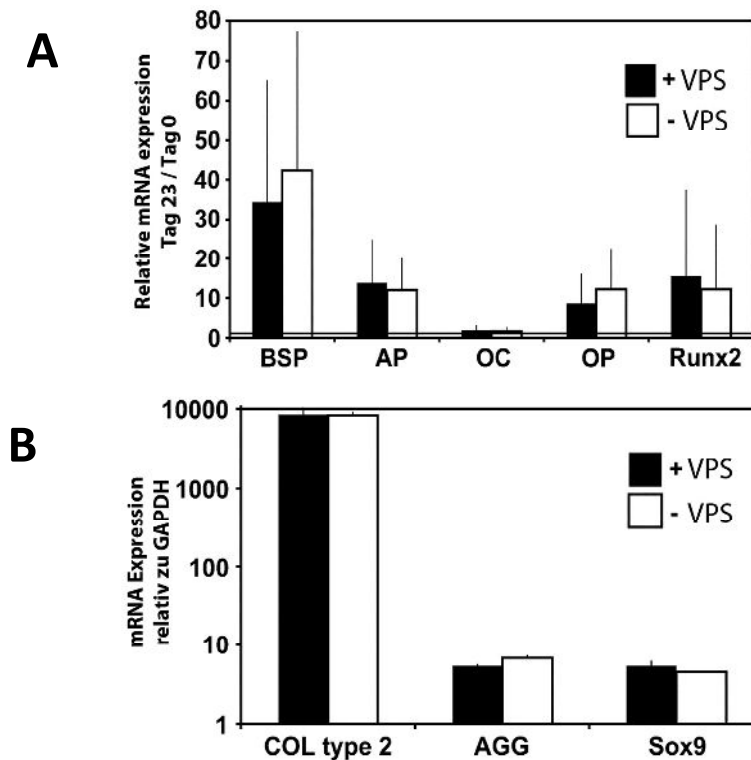


Abbildung 55: A) mRNA-Expression von osteogenen Marker-Genen *Bone Sialoprotein* (BSP), *Alkaline Phosphatase* (AP), *Osteocalcin* (OC), *Osteopontin* (OP) und dem Transkriptionsfaktor *Runx2* in Zellen mit Partikeln (Schwarze Balken) und ohne Partikeln (Weiße Balken) am Versuchstag 23. Die mRNA-Levels wurden zu denen von GAPDH normiert und in Relation zu denen von Tag 0 gesetzt (die mRNA-Expression am Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt), n=3. B) mRNA-Expression der chondrogenen Differenzierungsmarker *Collagen Typ 2* (COL type 2), *Aggrecan* (AGG) und dem Transkriptionfaktor *Sox9* in Zellen unter chondrogenen Differenzierungsbedingungen mit VPS-Partikel (schwarze Balken) und ohne (weiße Balken) am Tag 36 des Experiments. Die Level der mRNA wurden auf GAPDH normalisiert, n=3 (Ergebnisse von Andrea Tautzenberger).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Expression der chondrogenen Marker-Gene *Kollagen Typ 2* (COL type 2), *Aggrecan* (AGG) und dem Transkriptionfaktor *Sox9* unter chondrogenen Differenzierungsbedingungen gefunden (Abbildung 55 B). Wenn in undifferenzierten MSC keine Expression der Marker-Gene detektiert werden konnte, wurden sie unter chondrogenen Kultivierungsbedingungen nach 36 Tagen stark exprimiert und das unabhängig von der Anwesenheit der VPS-Partikel.

Um die adipogene Differenzierung der Zellen zu überprüfen, wurden die Gene *Lipoprotein Lipase* (LPL) und *Peroxisome Proliferator Aktivierender Rezeptor γ* (PPAR γ) in ihrer Expression semiquantitativ untersucht. Undifferenzierte MSC am Tag 0 zeigten keine Expression dieser adipogenen Marker-Gene, während sie unter Differenzierung am Tag 23 sehr stark exprimiert

wurden. Erneut wurde kein Unterschied zwischen VPS-behandelten und unbehandelten Zellen gefunden (Abbildung 56).

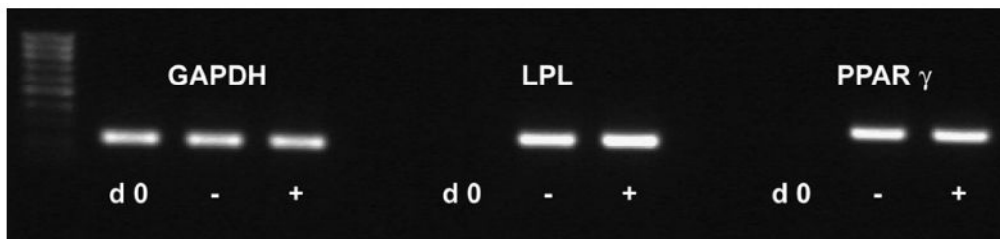


Abbildung 56: mRNA-Expression von GAPDH und den adipogenen Marker-Genen *Lipoprotein Lipase* (LPL) und *Peroxisome Proliferator Aktivierender Rezeptor γ* (PPAR γ) in undifferenzierten MSC am Tag 0 und MSC unter adipogenen Differenzierungsbedingungen ohne (-) und mit VPS (+)- Partikeln am Tag 23 des Experiments. Am Tag 0 wurde nur das Housekeeping Gen GAPDH exprimiert, n=3.

Bereits einige Autoren haben die Effekte von verschiedenen Partikeln auf die Differenzierung von MSC untersucht. Dabei wurde die Differenzierung aber bisher nur qualitativ oder auf einige Differenzierungslinien begrenzt durchgeführt. Fluoreszenzmarkierte biokompatible mesoporöse Silika-Nanopartikel wurden untersucht, ohne einen negativen Effekt auf die osteogene und adipogene Differenzierung von MSC zu zeigen^[168, 175]. Im Gegensatz dazu fanden einige Autoren einen negativen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von MSC nach der Behandlung mit biphasischen Kalziumphosphat-Partikeln, wie sie von Biokeramiken freigesetzt werden^[171]. Besonders Partikel aus Titan oder Kobalt-Chrom-Molybdän, die während des Tragens von Metallimplantaten auftreten, zeigten ein Unterdrücken der osteogenen Differenzierung^[176-177]. In einer anderen Studie wurden alle drei Differenzierungslinien von *Shah et al.*^[167] nach der Zugabe von kleinen, Licht-emittierenden Semikonduktor-Nanokristallen, sogenannten Quantum Dots, untersucht. Diese waren mit Carboxylgruppen, verlinkt mit einem kleinen Protein, funktionalisiert worden. Sie zeigten keinen Einfluss auf die Differenzierung. Für fluoreszierende und paramagnetische mesoporöse Silika-Nanopartikel, die in Zellverfolgungsstudien verwendet werden, wurde ebenfalls kein Einfluss auf die Differenzierungen gefunden^[178]. So kann man zusammenfassen, dass der Einfluss von Nanopartikeln auf die MSC-Differenzierung stark vom Typ der Partikel und deren Funktionalisierung abhängt. Die phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel, die in dieser Studie verwendet wurden, zeigten keinerlei Einfluss auf die Differenzierung von MSC.

6.3.3 Hydroxylapatit-funktionalisierte VBPS-Partikel und ihre Interaktion mit MSC

Für die Versuche zur Kalzifizierung wurden die VBPS-Partikel von Anke Zeller verwendet (siehe auch 6.3 und 6.3.1). Sie besitzen eine wesentlich höhere Phosphonatgruppendichte auf der Oberfläche als die VPS-Partikel und sind deshalb besser geeignet sowohl zur Anbindung der Kalziumionen und somit zur Bildung des Hydroxylapatits (HAP), als auch zur Bindung der Partikel auf Titanoxidoberflächen.

Da die HAP-beladenen Partikel in den weiteren Versuchen als Grundlage zur Beschichtung der Titanoberflächen eingesetzt werden sollen, wurden sie im Folgenden näher charakterisiert bzgl. ihrer Aufnahme in MSC und ihrer Toxizität. Die HAP-Beladung der Partikel wurde von Katrin Schöller durchgeführt.

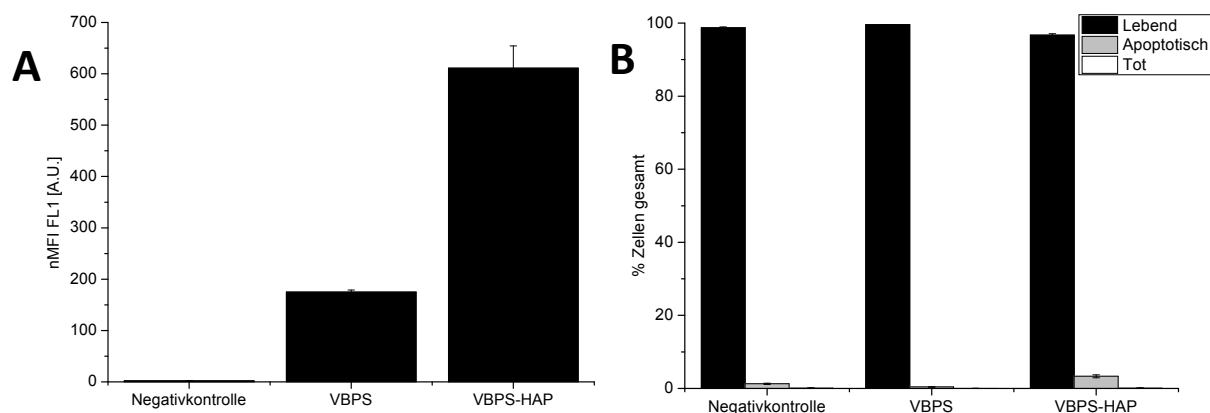


Abbildung 57: FACS-Analyse von MSC nach Inkubation mit VBPS-Partikeln mit und ohne HAP-Funktionalisierung für 20 h: A) Aufnahme der Partikel, dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität im FL1 in arbiträren Einheiten. Die Normierung erfolgte auf gemessene Fluoreszenz zum ungeladenen Partikel. B) zeigt die Zellvitalität die nach 20 h Partikel-Inkubation mit einer 7-AAD-Färbung im FACS gemessen wurde.

Die Untersuchungen im FACS zeigten eine Aufnahme der Partikel in MSC (Abbildung 57 A). Bereits die VBPS-Partikel ohne HAP wurden sehr gut in die Zellen aufgenommen. Eine Beladung der Partikel mit HAP bewirkt etwa eine Verdreifachung der Aufnahme in die Zellen. Eine Beschichtung mit HAP scheint die Partikeloberfläche für die Zellaufnahme noch zu verbessern. Dieser Effekt wurde bereits beschrieben^[179]. Auch eine Anlagerung von Proteinen aus dem Medium an diese HAP-Hülle der Partikel ist denkbar^[180], was ebenfalls zu einer zusätzlichen Funktionalisierung der Oberfläche mit Proteinen und dadurch besseren Aufnahme führen kann.

Eine Toxizität der VBPS-Partikel mit HAP war ebenso wenig nachweisbar wie für die VBPS-Partikel ohne HAP (Abbildung 57 B). Mehr als 95% der Zellen blieben am Leben, nachdem sie 20 h mit HAP-funktionalisierten VBPS-Partikeln inkubiert wurden.

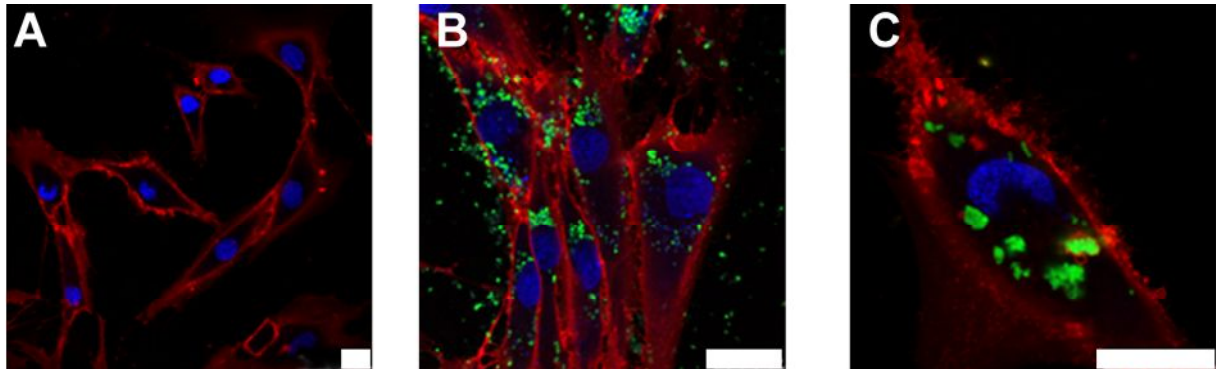


Abbildung 58: MSC nach Betrachtung im CLSM: A) zeigt die Negativkontrolle, B) die Zellen inkubiert mit VBPS-Partikeln für 20 h und C) inkubiert mit Hydroxylapatit-funktionalisierte VBPS-Partikeln, alles nach 20 h Inkubation. (Zellwand rot gefärbt mit CellMask™ Orange, Partikel grün (PMI), Zellkern blau gefärbt mit DRAQ5®). Größenbalken: 25 µm

Bestätigt wurde die Aufnahme der VBPS-Partikel mit und ohne HAP-Funktionalisierung durch CLSM-Aufnahmen, um ein extrazelluläres Anhaften der Partikel auszuschließen. Die Aufnahmen des CLSM zeigen deutlich die gute Aufnahme der VBPS-Partikel ins Innere der MSC (Abbildung 58 B). Aber auch außerhalb sind noch immer einige wenige Partikel zu erkennen. Es fällt dabei, wie unter 6.3.1 beobachtet, eine leichte Aggregation der VBPS-Partikel auf. Die HAP-beladenen VBPS-Partikel in Abbildung 58 C sind überwiegend im Zellinneren zu finden. Allerdings scheinen diese Partikel weitaus größere Aggregate zu bilden. Auch diese Aggregation könnte auf eine Proteinanlagerung zurückzuführen sein. Auf die Aufnahme scheint dies aber keinen Einfluss zu haben, was sowohl aus der CLSM-Aufnahme in Abbildung 58 C wie auch aus dem FACS-Ergebnis aus Abbildung 57 A ersichtlich ist.

Nachdem sich die HAP-funktionalisierten VBPS-Partikel als geeignet für die Zellversuche gezeigt haben und eine Funktionalisierung von Polystyrolnanopartikeln mit Phosphonatgruppen in MSC keinen negativen Einfluss auf Vitalität und Differenzierungspotential zeigten, wurden VBPS-Partikel auf Titanoxid-Oberflächen aufgebracht, um das Zellwachstum auf diesen Schichten näher zu untersuchen.

6.3.4 Funktionalisierung von Titanoberflächen mit VPBS-Nanopartikeln und das resultierende Anhaften und Wachstum von MSC

VPBS-Partikel-beschichtete Titanoxid-Oberflächen wurden mit MSC in Zellkultur getestet. Dabei ging es in erster Linie darum, das Anhaften der Zellen auf der Oberfläche zu überprüfen sowie die Stabilität der Partikelbindung auf der Oberfläche unter Zellkulturbedingung, Zellwachstum und Migration einzuschätzen.

Dazu wurden von Kilian Schuller und Anke Zeller Titan besputterte Siliziumwaver über Spincoating mit einer homogenen Schicht VBPS-Partikel beschichtet. Da die Bedingungen für eine erfolgreiche Beschichtung neu etabliert werden mussten, wurde der Versuch mit kleinen Wavern in der Größe 1x1 cm durchgeführt. Auf dieser Fläche lassen sich allerdings lediglich maximal etwa 50.000 MSC kultivieren. Deshalb ist es bisher leider nicht möglich gewesen, FACS-Analysen mit Zellen dieser Proben durchzuführen, wofür eine Zellzahl von mindestens 200.000 Zellen zur Präparation für einen Ansatz nötig wäre. Auch ist die Herstellung einheitlicher Substrate sehr aufwendig. Für die Zellversuche wurden zwei Substratoberflächen verglichen: Titanoxid und Titanoxid mit VBPS-Partikel. Die Untersuchungen erfolgten aufgrund der genannten Einschränkung bisher nur mit Hilfe des CLSM.

Zunächst wurde das Titan-Substrat ohne Partikelbeschichtung betrachtet. Dazu wurden MSC mit einer Dichte von $10.000 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ ausgesät und nach 24 h die Anhaftung und Bedeckung der Oberfläche untersucht. Es zeigte sich eine dichte Bewachung der Oberfläche mit Zellen (Abbildung 59), die allerdings am Rand des Substrats eine leichte Ablösung der Zellen aufwies. Somit lässt sich feststellen, dass Titanoberflächen bereits sehr gut für das Zellwachstum geeignet sind, was nicht verwundert, da die Bioverträglichkeit von Titan bereits umfassend in der Literatur beschrieben ist ^[181-182]. Andererseits ist bereits schon lange bekannt, dass das Anhaften der Zellen auf derartigen Oberflächen, die keine Oberflächenbehandlung oder Modifikation aufweisen, nicht sehr effizient und mit fester Bindung passiert ^[183].

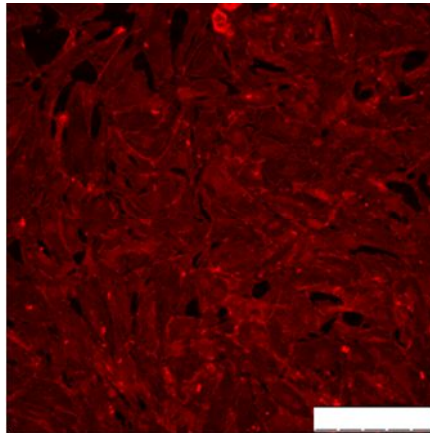


Abbildung 59: CLSM-Aufnahme vom MSC-Wachstum auf mit TiO₂-bespanntem Wafer nach 24 h. Die Zellen wurden mit CellMask™ Orange gefärbt und sind rot zu sehen. Größenbalken 250 µm.

Der Test des Partikel-beschichteten Waver ergab zum einen eine sehr homogene Verteilung der Partikel auf dem Waver (Abbildung 60 links), was die REM-Aufnahmen von Anke Zeller bestätigen (siehe auch Abbildung 45). Die Partikel lösen sich unter Zellkulturbedingungen mit Medium nicht von der Titanoxidoberfläche ab. Deshalb ist die Oberfläche für das Wachstum von MSC geeignet. Zum anderen wuchsen die Zellen auch nach 24 h auf diesem partikelbeschichteten Substrat sehr dicht (Abbildung 60 rechts). Die Zellen zeigten keine Ablösungserscheinungen. Die Vergrößerung der Oberfläche und das Anbieten von negativ geladenen Gruppen (Phosphonat) verbessert offensichtlich das Wachstum und das Anhaften der Zellen auf der Oberfläche der Waver erheblich^[184-185]. Die Partikel zeigen eine hohe Haftung an der Oberfläche und werden nach den bisherigen Beobachtungen nicht abgelöst. Es sind keine „Fraßspuren“ der Zellen auf den Substraten zu erkennen, die auf ein Ablösen der Partikel durch migrierende Zellen hindeuten (Abbildung 60 rechts).

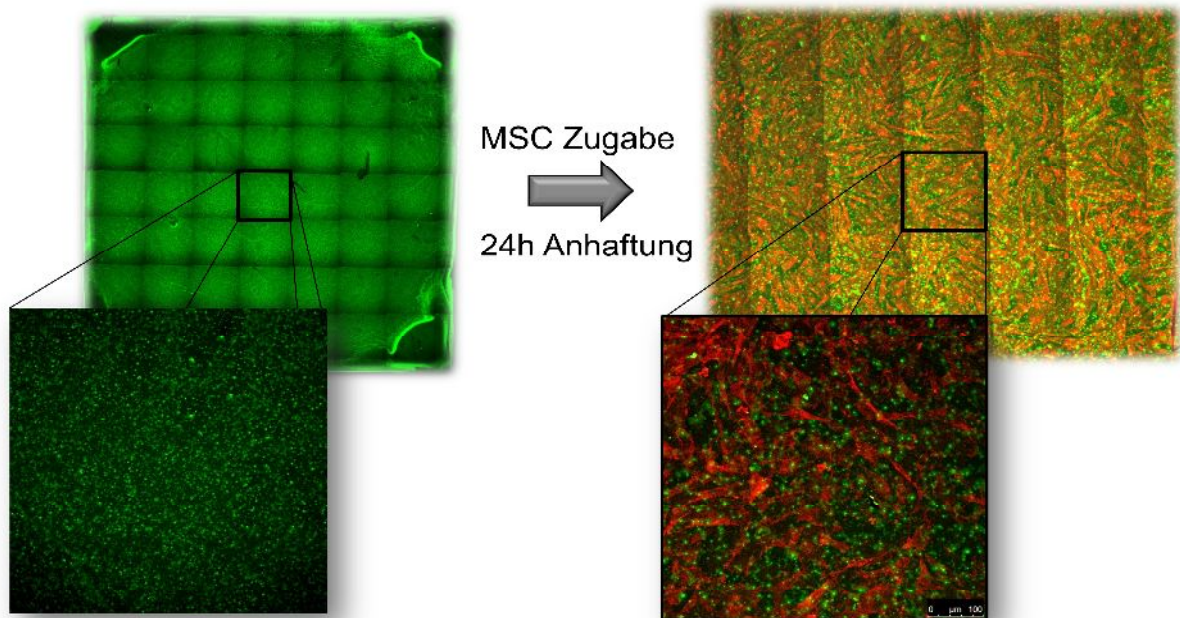


Abbildung 60: CLSM von Titan-Wavern. Links: Substrat komplett dargestellt (1x1 cm) und Ausschnittvergrößerung (unten, ca. 1,3x1,3 mm). Grün ist die Fluoreszenz des PMIs der VBPS-Partikel dargestellt. Der Gittereffekt im Bild entsteht beim Zusammenfügen der Bilder durch die Abschattung am Rand jedes einzelnen Bildes. Rechts: Substrat mit MSC (gefärbt mit CellMask™ Orange) bewachsen (ca. 2x3 mm) nach 24 h Zellwachstum und Ausschnittvergrößerung (0,5x0,5 mm).

Um zu überprüfen, ob die Zellen eine VBPS-beschichtete Titanoberfläche einer Oberfläche ohne Partikel vorziehen, wurde ein Substrat verwendet, auf das durch Auftropfen eine Partikelschicht aufgebracht worden ist. Dadurch war nicht das ganze Substrat mit Zellen bedeckt, sondern lediglich etwa 30%. Der angehaftete Partikel tropfen ist in Abbildung 61 zu sehen. Er erwies sich als stabil unter Zellkulturbedingungen. Deshalb wurden erneut MSC auf diesem Waver gleichmäßig verteilt aufgebracht, allerdings lediglich in einer Dichte von 1.000 Zellen pro cm^2 . Durch eine Inkubationszeit von 48 h hatten die Zellen genug Zeit, sich anzuhafte und auch auf der Probe zu migrieren, d.h. zu der für sie angenehmsten Stelle zu wandern. Nach 48 h zeigte sich bei der Betrachtung des Partikelbereiches und des Bereiches um den Partikel, dass die meisten Zellen in den VBPS-Partikel-beschichteten Bereich gewandert waren (Abbildung 62). Die Zellen bevorzugten damit die beschichtete Titanoxid-Oberfläche gegenüber der unbeschichteten Oberfläche.

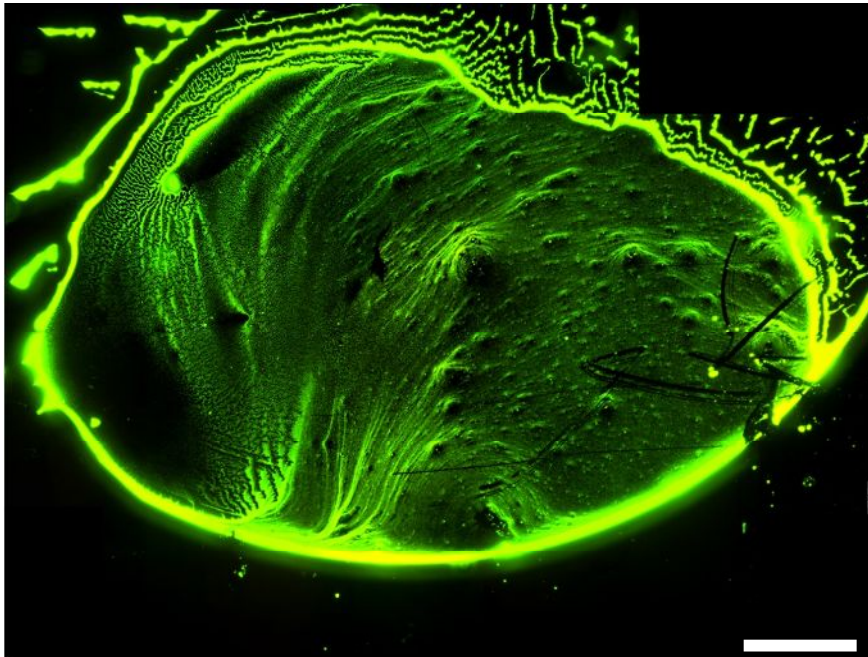


Abbildung 61: VBPS-Partikel tropfen adhärirt auf einem TiO₂-Waver. Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Partikel sind in grün zu sehen (PMI). Größenbalken: 500 µm.

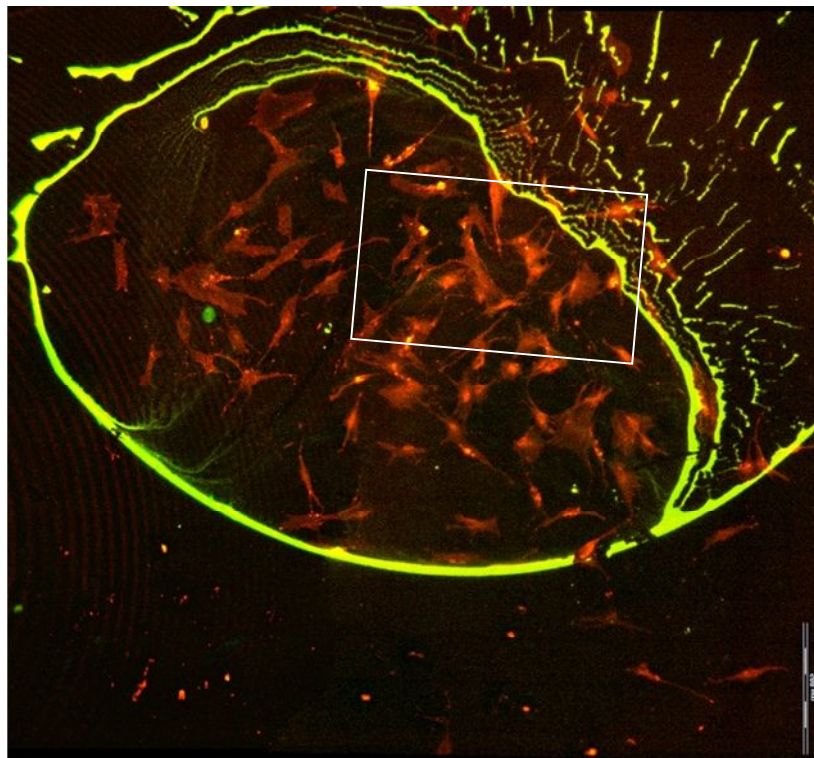


Abbildung 62: VBPS-Partikel tropfen adhärirt auf einem TiO₂-Waver. Darstellung 48 h nach Zell-Zugabe und Wachstum mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops; Dargestellt ist nur der Rote Kanal der Cellmask™ Orange gefärbten Zellen und der grüne Kanal mit PMI. Das eingezeichnete Fenster zeigt den Bereich zu dem eine REM-Aufnahme angefertigt wurde. Größenbalken Seite: 500 µm.

Der in Abbildung 62 eingezeichnete Ausschnitt wurde im REM untersucht, um festzustellen, ob die Partikeloberfläche unversehrt bleibt. Außerdem war es möglich zu prüfen, ob eine korrelative Mikroskopie aus REM und Fluoreszenzmikroskopie durch nachträgliches Überlagern der Bilder erfolgen kann. Für die Betrachtung im REM wurden die Zellen mit Ethanol fixiert, die Probe für 48 h getrocknet, bevor sie im REM betrachtet wurde. Die Partikeloberfläche zeigte sich im REM unbeschädigt (Abbildung 63). Um die Zellen herum, die sich ohne zusätzliche Präparation mit einem geringen Kontrast abheben, waren keine „Fraßspuren“ zu erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass die Zellen nicht in der Lage sind, Partikel von der Oberfläche abzulösen.

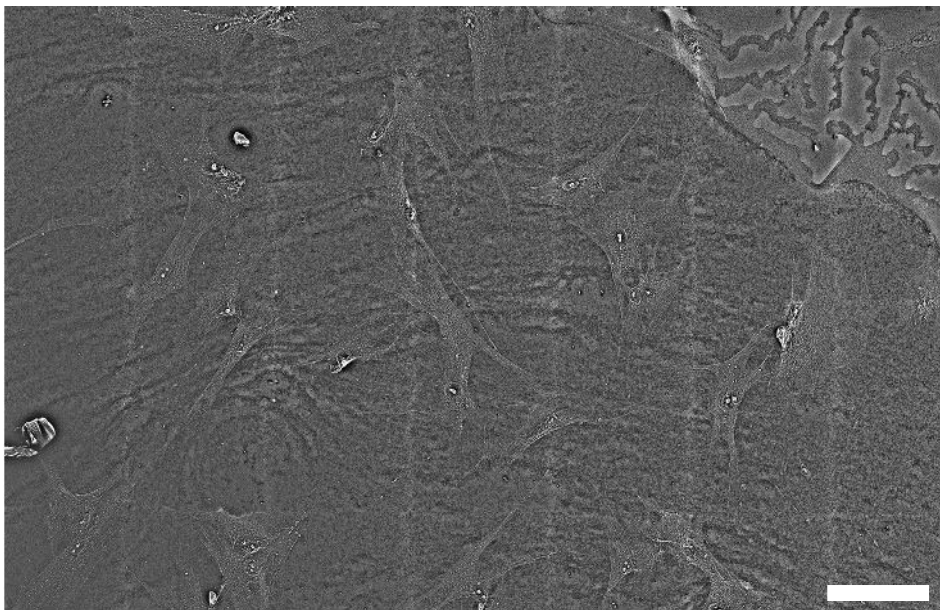


Abbildung 63: REM-Aufnahme des in Abbildung 62 dargestellten Fensters mit Niedrigspannung bei 80V. Zellen wurden für diesen Versuch lediglich mit Alkohol fixiert und anschließend getrocknet. Es ist das aus 42 Aufnahmen gewonnene Bild dargestellt (34 Megapixel). Größenbalken: 100 μm . Die Aufnahme entstand mit der freundlichen Hilfe von Herrn Glaßer.

Eine Überlagerung und die Darstellung eines REM-Bildes kombiniert mit einem fluoreszenzmikroskopischen Bild war im Nachhinein möglich und ergab ein Bild, das den Vorteil der hohen Auflösung im REM mit der Fluoreszenz verbinden lässt (Abbildung 64).

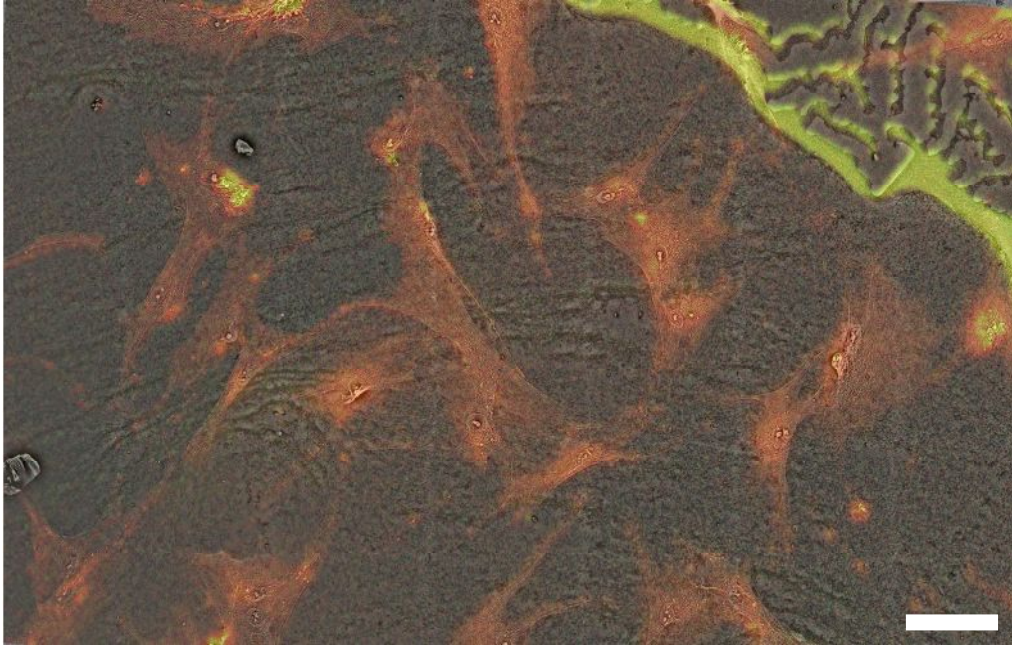


Abbildung 64: Korrelative Mikroskopie: Überlagerung des Fensters der Fluoreszenzaufnahme aus Abbildung 62 mit der REM-Aufnahme aus Abbildung 63. Die Überlagerung wurde im Nachhinein mit Adobe® Photoshop® CS3 durchgeführt. Größenbalken: 100 µm.

Die Verwendung von VBPS-partikelbeschichteten Titanoxid-Oberflächen zeigte Vorteile für das Wachstum und Anhaften der Zellen. Die Zellen waren in der Lage, sich sehr gut an diese Oberflächen zu haften und bevorzugten diese gegenüber den unbeschichteten Oberflächen.

Ein weiterer Schritt wäre, diese Oberflächen mit HAP zu beschichten und in Zellkultur zu untersuchen. Diese Untersuchungen waren während der Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen und konnten somit leider nicht mehr bei der vorliegenden Arbeit Berücksichtigung finden. Auch Differenzierungsversuche mit MSC auf diesen Oberflächen sind geplante Untersuchungen, die zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch ausstanden.

6.3.5 Aufnahme von Zytotoxizität von Wirkstofftragenden Nano-Kapseln und Partikeln

Der letzte Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich mit wirkstofftragenden Nanokapseln und Partikeln. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit auf die Aufnahme und Toxizität in MSC getestet. Sie sollen später mit phosphonat-funktionalisierten Oberflächen auf Titanoxidoberflächen aufgebracht werden, um dort ihre Wirkstoffe freizusetzen.

PLA-Dexamethason-Partikel, die unter 6.3 näher beschrieben sind, sollen durch die Freisetzung von Dexamethason die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten stimulieren. Dexamethason wurde deshalb gewählt, da es im Gegensatz zu dem knochenwachstum-stimulierenden Protein BMP wesentlich billiger für erste Tests war, auch wenn die Spezifität geringer ist.

Die Partikel wurden in einer Konzentration von 75 µg/mL mit dem MSC inkubiert und die Aufnahme nach 20 h im FACS gemessen. Während die Nullpartikel PLA-Null ohne Dexamethason (Tabelle 7) ebenso gut wie die 2% Dexamethason-Partikel PLA-2%Dex in MSC aufgenommen werden (Abbildung 65 A), werden die Partikel PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason mehr als doppelt so gut aufgenommen. Eingelagertes Dexamethason scheint damit in höheren Konzentrationen die Oberfläche der Partikel zu beeinflussen, so dass eine Beeinflussung der Partikelaufnahme in Zellen auftritt. Von anderen Arbeitsgruppen ist bereits bestätigt, dass Dexamethason an Zelloberflächen bindet^[186-187]. Darin werden auch Rezeptoren als mögliche Bindungspartner genannt. So wäre es möglich, dass diese Eigenschaft zu einer erhöhten Zellassoziation führt und dadurch zu einer erhöhten Aufnahme in MSC führt. Tatsächlich war im CLSM eine Aufnahme aller Partikel ins Zellinnere zu erkennen (Abbildung 67 B-D). Auch waren bei den Partikeln PLA-2%Dex mit 2% Dexamethason viele membrangebundene Partikel zu finden (Abbildung 67 C), allerdings nicht bei den Partikeln PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason und den Nullpartikeln PLA-Null (Abbildung 67 B und D). Bei 5% Dexamethason-Partikeln sind größere Partikelaggregate zu erkennen (Abbildung 67 D), die auch in den Zellen zu finden sind. Während eine Membranakkumulation zu der genannten Theorie passt, erklärt sie nicht die Aggregation bei den Partikeln PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason. Vielleicht spielen noch weitere Faktoren eine Rolle, die bisher nicht geklärt sind. Die Aggregation wirkt sich aber offenbar nicht negativ auf die Aufnahme aus.

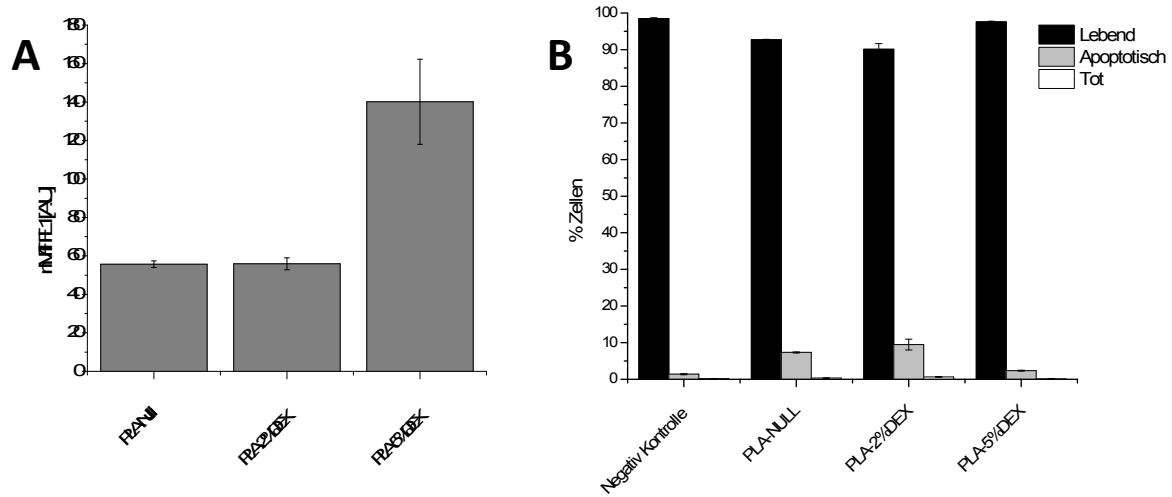


Abbildung 65: FACS-Analyse nach 20 h Inkubation in MSC mit PLA-Partikeln. A) Aufnahme der Partikel in die Zellen. B) Zytotoxizität der Partikel bestimmt mit 7-AAD-Messung und verglichen mit der Negativkontrolle. Ergebnisse sind Median-Werte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

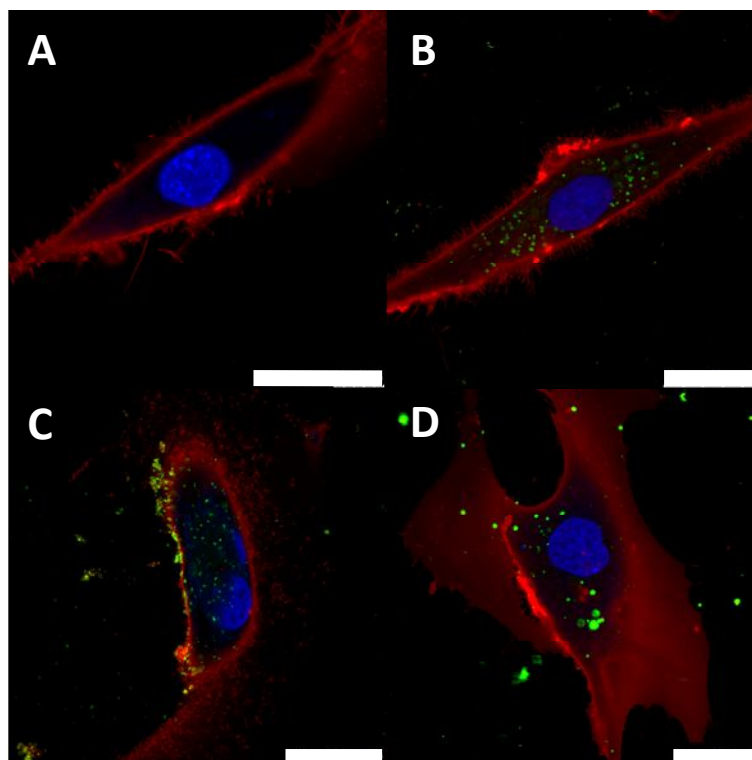


Abbildung 66: CLSM-Aufnahmen von MSC nach 20 h Inkubation: A) Negativ Kontrolle, B) PLA-Null-Partikel, C) PLA-2%DEX-Partikel, D) PLA-5%DEX-Partikel. Die Fluoreszenz der Partikel ist in grün dargestellt (PMI), die Zellmembran rot (CellMask™ Orange) und der Zellkern blau (DRAQ5™). Größenbalken: 25 μm.

Die Untersuchung der Toxizität der Partikel nach 20 h Inkubation in MSC zeigte überwiegend lebende Zellen (Abbildung 65 B). Allerdings ist eine leichte Erhöhung der Toxizität bei den

Nullpartikeln PLA-Null und den Partikeln PLA-2%Dex mit 2% Dexamethason zu erkennen. Mehr als 90% der Zellen sind aber nach 20 h bei jedem Partikel noch vital.

Die Aufnahme der PLA-Partikel nimmt über die Zeit der Inkubation von 7 Tagen weiter zu. Die FACS-Analyse am Tag 7 der Inkubation zeigt deutlich, dass im Fall aller Partikel höhere Aufnahmewerte gemessen werden konnten (Abbildung 67 A) als nach 20 h Inkubation (vergl. Abbildung 65 A). Dabei nimmt die Aufnahme der Null-Partikel PLA-Null und der Partikel PLA-2%Dex mit 2% Dexamethason in Relation zu den Partikeln PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason mehr zu. Die Nullpartikel PLA-Null liegen fast gleichauf mit der Probe mit den Partikeln PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason, während die Partikel PLA-2%Dex mit 2% Dexamethason eine etwa halb so gute Aufnahme erreichen wie die Partikel PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason. Über die Zeit von 7 Tagen scheinen sich die Vorteile in der Aufnahme durch das Dexamethason immer mehr zu relativieren.

Die Toxizität der Partikel nach 7 tägiger Inkubation zeigte mehr als 25% apoptotische Zellen bei der Nullpartikel-Probe PLA-Null und mehr als 10% apoptotische Zellen bei der Partikel-Probe PLA-2%Dex mit 2% Dexamethason. Bei der Negativkontrolle und den Zellen inkubiert mit Partikeln PLA-5%Dex mit 5% Dexamethason sind mehr als 95% der Zellen vital. Nach 7 Tagen scheint eine allgemeine Toxizität der Partikel aufzutreten, die durch das eingebettete und freiwerdende Dexamethason gemindert wird. Der antiapoptotische Effekt von Dexamethason ist bereits beschrieben^[188-189]. Deshalb wirkt sich eine zunehmende Konzentration von Dexamethason hinsichtlich der Zellvitalität nach 7 tägiger Partikelinkubation positiv aus.

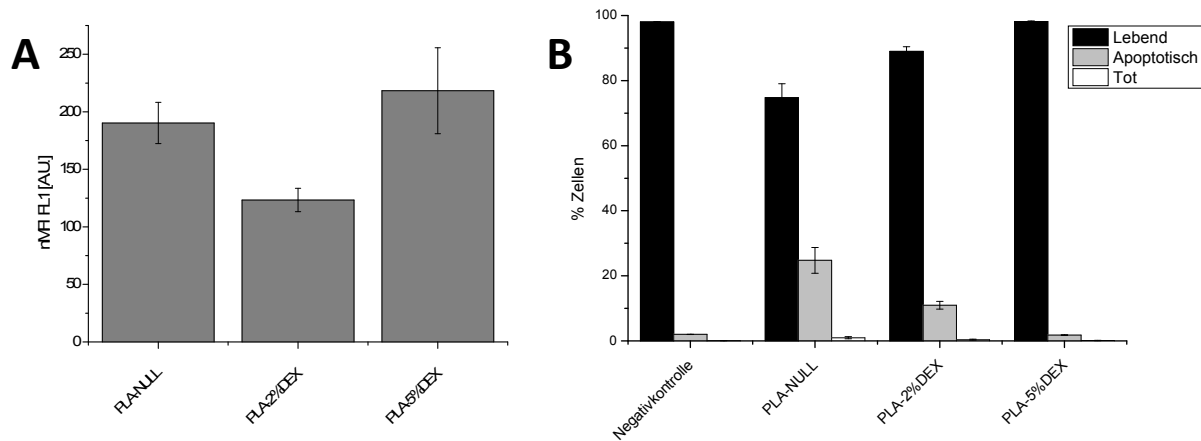


Abbildung 67: FACS-Analyse nach 7 tägiger Inkubation mit PLA-Partikeln. A) Aufnahme der Partikel in MSC. B) Zytotoxizität der MSC mit Partikeln verglichen mit der Negativkontrolle, bestimmt mit 7-AAD-Messung. Ergebnisse sind Median-Werte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Durch die Verkapselung von Bisphosphonat und dessen gezielte Freisetzung soll bei Osteoklasten eine Inhibition der Aktivität bewirkt werden. Die zur Verkapselung verwendeten Kapseln bestehen aus Polyurethan und Polyharnstoff. Sie sind unter 6.3 näher beschrieben. Da in unserer Gruppe zum Zeitpunkt der Experimentdurchführung keine Osteoklastenkulturen etabliert waren, wurden die erste Aufnahme- und Toxizitätsstudien an MSC durchgeführt, bevor unsere Kooperationspartner die Aufnahme, Toxizität und Wirkung an Osteoklasten testen.

Im FACS zeigte sich eine sehr geringe Aufnahme der Polyurethan-Kapseln in MSC (Abbildung 68 A), die im Fall der Bisphosphonat-enthaltenden Kapseln sogar noch etwas geringer ausfiel als in den Polyurethan-Nullkapseln. Diese geringe intrazelluläre Aufnahme wurde im CLSM bestätigt (Abbildung 69 B und C). Polyurethan als Polymer eignet somit sich besonders dann, wenn eine die Zellaufnahme der Kapseln nicht erwünscht ist.

Eine bessere Zellaufnahme wurde mit Polyharnstoffkapseln erreicht (Abbildung 68 A). Die Bisphosphonat-enthaltende Kapseln wurden etwa doppelt so gut aufgenommen wie die Nullkapsel. Dieser Effekt ist nicht zu erklären. Die Aufnahme und intrazelluläre Lokalisation ließ sich allerdings im CLSM bestätigen (Abbildung 69 D und E). Im CLSM wurden bei den Polyharnstoffkapseln einige Aggregate gefunden.

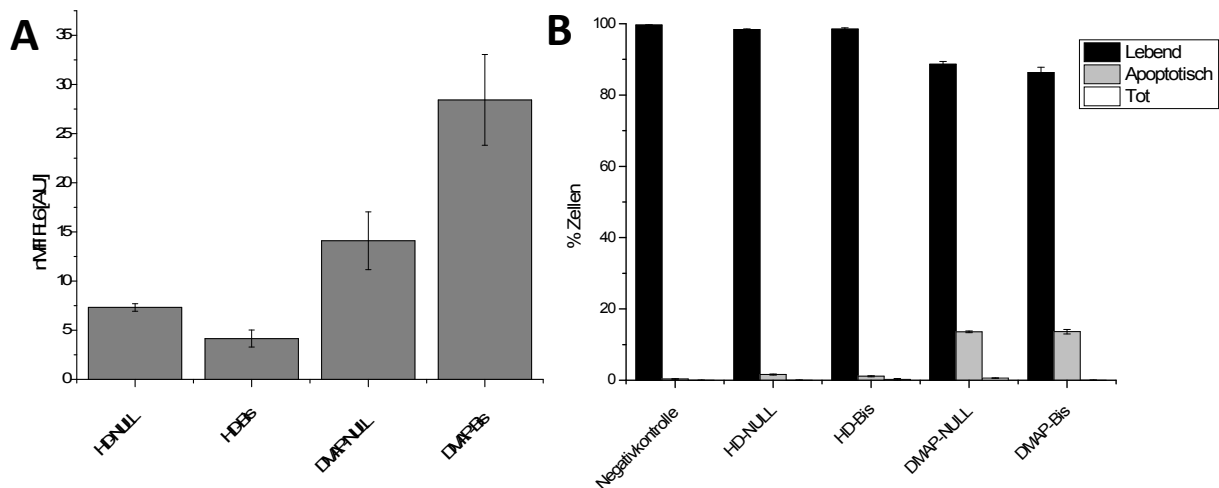


Abbildung 68: FACS-Analyse nach 20 h Inkubation in MSC mit Polyurethan (HD)- und Polyharnstoff (DMAP)-Kapseln (Tabelle 7). A) Aufnahme der Kapseln in die Zellen. B) Zytotoxizität der Kapseln bestimmt mit 7-AAD-Messung und verglichen mit der Negativkontrolle. Ergebnisse sind Median-Werte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Während die Polyurethankapseln keine signifikante Erhöhung der Toxizität im FACS bei einer 7-AAD-Färbung ergaben und über 95% der Zellen vital waren, führten die Polyharnstoffkapseln zu einer Toxizitätserhöhung. Etwa 15% der Zellen gingen in Apoptose unabhängig von der Wirkstoffbeladung. Da Harnstoff nicht toxisch für die Zellen sein sollte, könnte es sein, dass bereits nach 20 h andere Abbauprodukte entstehen, z.B. Isocyanat-Verbindungen, die sich toxisch auf die Zelle auswirken. Aufgrund der Toxizität sind diese Kapseln nicht für einen längeren Einsatz in Osteoklastenkulturen geeignet, da diese noch wesentlich empfindlicher reagieren als MSC.

Für die Zukunft wird es nötig sein, weitere Verkapselungssysteme zu testen. Da aber für eine Wirkstofffreisetzung von Implantat-Oberflächen keine Zellaufnahme nötig ist, wäre eine Weiterführung des Versuchs mit Polyurethan-Kapseln, wegen der schlechten Zellaufnahme, denkbar. Außerdem kann durch eine zum Anbinden auf Titanoxidoberflächen nötige Funktionalisierung mit Phosphonatgruppen sich die Aufnahme in Zellen noch.

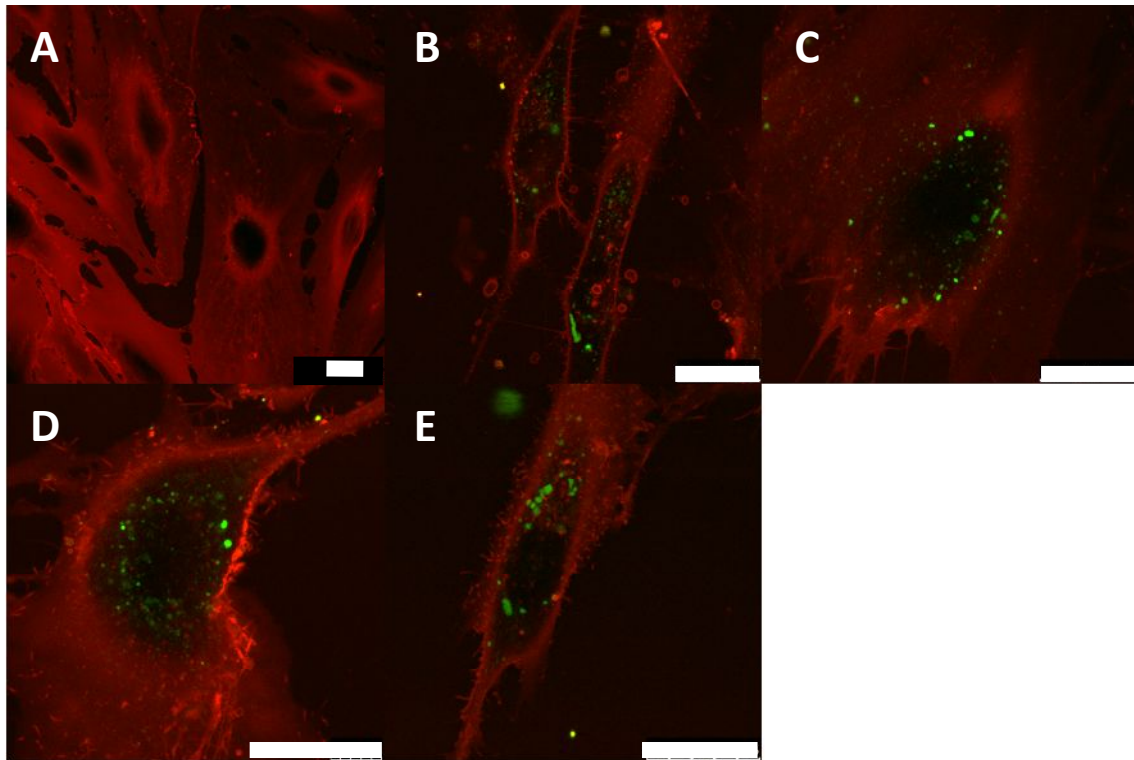


Abbildung 69: CLSM-Aufnahmen von MSC mit A) Negativkontrolle, B) HD-NULL-Kapsel C) HD-Bis-Kapsel D) DMAB-NULL-Kapsel E) DMAB-Bis-Kapsel. Die Fluoreszenz der Kapseln ist in Grün dargestellt (Sulforhodamin 101), die Zellmembran Rot (CellMask™ Orange). Größenbalken: 25 μm .

6.4 Etablierung neuer Methoden zum Studium der Partikelaufnahme in Zellen

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden einige Methoden in der Arbeitsgruppe neu etabliert. Dies war nötig, da sich durch neue technische Geräte, wie die Verwendung eines Mehr-Laser-FACS oder der STED-Technik neue Möglichkeiten ergaben, neue Untersuchungen durchzuführen.

Zu zwei dieser neuen Methoden wurden erste Versuche gemacht, die für zukünftige Arbeiten als Grundlage dienen sollen. Diese werden in diesem Kapitel und die gewonnenen Erfahrungen dargestellt.

6.4.1 Zellzyklusabhängige Aufnahme von Partikeln

Wie in 5.2.2 beschrieben, ist es möglich, mit der FACS-Technik den Vermehrungszyklus einer Zelle, den sogenannten Zellzyklus darzustellen. Dazu wurden bereits viele Arbeiten durchgeführt^[190-191]. Die ersten gehen bis auf die 1970er-Jahre zurück^[192]. Die Idee die Zellzyklus-abhängige Aufnahme zu untersuchen, ist nicht neu. Diese Untersuchungen sind wichtig z.B. zur Behandlung von Krebs^[193-195], Virusinfektions- und Replikations-Mechanismen^[196] und bei Zellfunktionsstudien^[197]. Aber auch die Abhängigkeit der Aufnahme von Nanopartikeln zum Stand der Zelle im Zellzyklus ist sehr interessant und bisher nicht untersucht. Gerade für den Wirkstofftransport mit Nanopartikel in Zellen ist es wichtig zu wissen, ob eine Zelle in der Lage ist, die Partikel effizient aufzunehmen. Zellen, die in einer Phase des Zellzyklus ruhen, könnten sonst von der Aufnahme der Nanopartikel ausgeschlossen sein.

Diese Untersuchungen werden mit der Zellzyklusanalyse möglich. Im FACS wird es mit Hilfe dieser Methode möglich sein, Partikelaufnahme parallel zur Zellzyklusanalyse durchzuführen. Mit Hilfe des unter 5.2.2 beschriebenen Protokolls war es möglich, in dieser Arbeit die Darstellung eines Zellzykluses in Jurkat-Zellen mit der Verwendung von Propidium-Iodid (PI) zu erreichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 70 A zu sehen. Es konnten alle Phasen des Zellzykluses dargestellt werden. Im Vergleich zu Abbildung 70 B ist zu beachten, dass bei dem eigenen Ergebnis fragmentierte DNA (vor dem G0/G1-Peak) und Zell-DNA-Schrott (hinter dem G2/M-Peak) nicht durch Ausschluss entfernt wurden, wie in Abbildung 70 B.

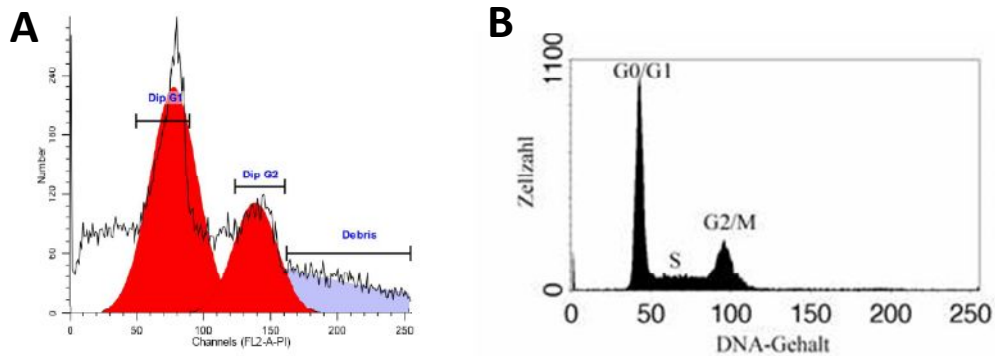


Abbildung 70: Zellzyklus-Analyse im FACS mit PI-Färbung. A) Eigenes Ergebnis. Der G0/G1- und der G2/M-Peak sind rot markiert und beschriftet. B) Muster für einen Zellzyklus^[198]. Die einzelnen Phasen sind beschriftet. G: Ruhephasen (Gap), S: Synthese-Phase der DNA (Genom-Verdopplung), M: Zellteilung (Mitose).

Somit ist es gelungen, die Darstellung eines Zellzykluses mit Jukat-Zellen im FACS zu erhalten. Studien in Relation zur Partikelaufnahme konnten im Umfang dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden, sind aber ein wichtiger Punkt für zukünftige Arbeiten.

6.4.2 Analyse der Partikelaufnahme lebender Zellen im STED

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht das Beobachten von lebenden Zellen und zelluläre Prozesse mit Fluoreszenzmarkern. Die Grenzen sind durch die Auflösung von minimal 200 nm gegeben. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht zwar eine weitaus bessere Auflösung, allerdings nur für fixierte Zellen. Mit Hilfe der STED-Mikroskopie ist es möglich, Fluoreszenzmikroskopie mit einer Auflösung von 70 nm und darunter durchzuführen (siehe auch 4.2 und 5.2.4). Bisher beschränkte sich diese Mikroskopie allerdings auf die Darstellung von fixierten Zellen^[192]. Da die Bewegung von Zellen bei dieser hohen Auflösung problematisch ist, ist es nötig, eine schnelle Bildgewinnung bei optimaler Auflösung zu erreichen, um Nanopartikel in Zellen darstellen zu können. Diese Optimierungsarbeit wurde zusammen mit Dr. Turshatov im Rahmen dieser Arbeit begonnen. Zeitgleich mit der Fertigstellung unserer Ergebnisse wurde die Methode auch von *Schübbe et al.* publiziert^[115].

MSC stellten sich als ungeeignet für STED-Mikroskopie heraus. Sie besaßen eine sehr hohe Eigenfluoreszenz, die fast über das gesamte Spektrum verlief und auch im Bereich des STED-Lasers (594 nm) noch sehr hoch war. Die Eigenfluoreszenz von Zellen ist ein bekanntes Phänomen^[199]. HeLa-Zellen besitzen eine hohe Eigenfluoreszenz im UV-Bereich^[200]. Im

Bereich des STED-Lasers bei 594 nm ist sie dagegen sehr gering. Aus diesem Grund wurden für diese Versuche HeLa-Zellen verwendet. Die Eigenfluoreszenz wird stärker, wenn die Zellen in Apoptose gehen^[200]. Somit wurde besonders auf ununterbrochen optimale Kulturverhältnisse bis zur Mikroskopie geachtet, um die Zellen vital zu halten. Damit war ein Störsignal durch Eigenfluoreszenz selbst bei den nötigen hohen Verstärkungen nicht problematisch. Hohe Verstärkungen waren deshalb nötig, da die Bildgewinnungsgeschwindigkeit sehr hoch sein musste, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Später wurde deshalb vom PMT (Photomultiplier) als Detektor zur APD (Avalanche Photodiode) gewechselt. APDs besitzen im Bereich von unterhalb 600 nm zwar keine Sensitivitätsvorteile gegenüber PMTs, jedoch besitzen sie praktisch kein Rauschen, das bei PMTs mit höherer Verstärkung zunehmend zum Problem wird. Auf einen Membranfarbstoff wurde zunächst verzichtet, um diesen als Störquelle auszuschließen.

Die Aufnahmen wurden mit Polystyrol-Nanopartikel durchgeführt, die den Fluoreszenzfarbstoff Bodipy enthalten. Diese Partikel erwiesen sich als sehr stabil in STED, sowohl was das Polystyrol als auch den Farbstoff Bodipy betrifft, der keinerlei Photobleichung zeigte. Das verwendete Bodipy besitzt sein Anregungsmaximum bei 503 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 512 nm. Der verwendete Partikel ist in Tabelle 8 zu sehen.

Tabelle 8: Partikel mit Bodipy-Farbstoff von Christoph Hauser. (D_z = mittlere Partikel-Größe)

Monomer	Fluoreszenzfarbstoff	D_z in nm
Styrol	Bodipy	139±11

Für den gezeigten Versuch wurden HeLa-Zellen mit 300 µg/mL Partikelsuspension für 20 h inkubiert. In Abbildung 71 B ist die konfokale Aufnahme einer HeLa-Zelle (Durchlichtbild der Zelle siehe Abbildung 71 A) zu sehen, die sehr viele Partikel trägt. Zum Vergleich sieht man in Abbildung 71 C das gleiche Bild als STED-Aufnahme. Es ist zu sehen, dass die Partikel wesentlich besser aufgelöst dargestellt werden und so eine Unterscheidung ermöglichen, ob es sich um Konglomerate handelt oder um einzelne größere Partikel.

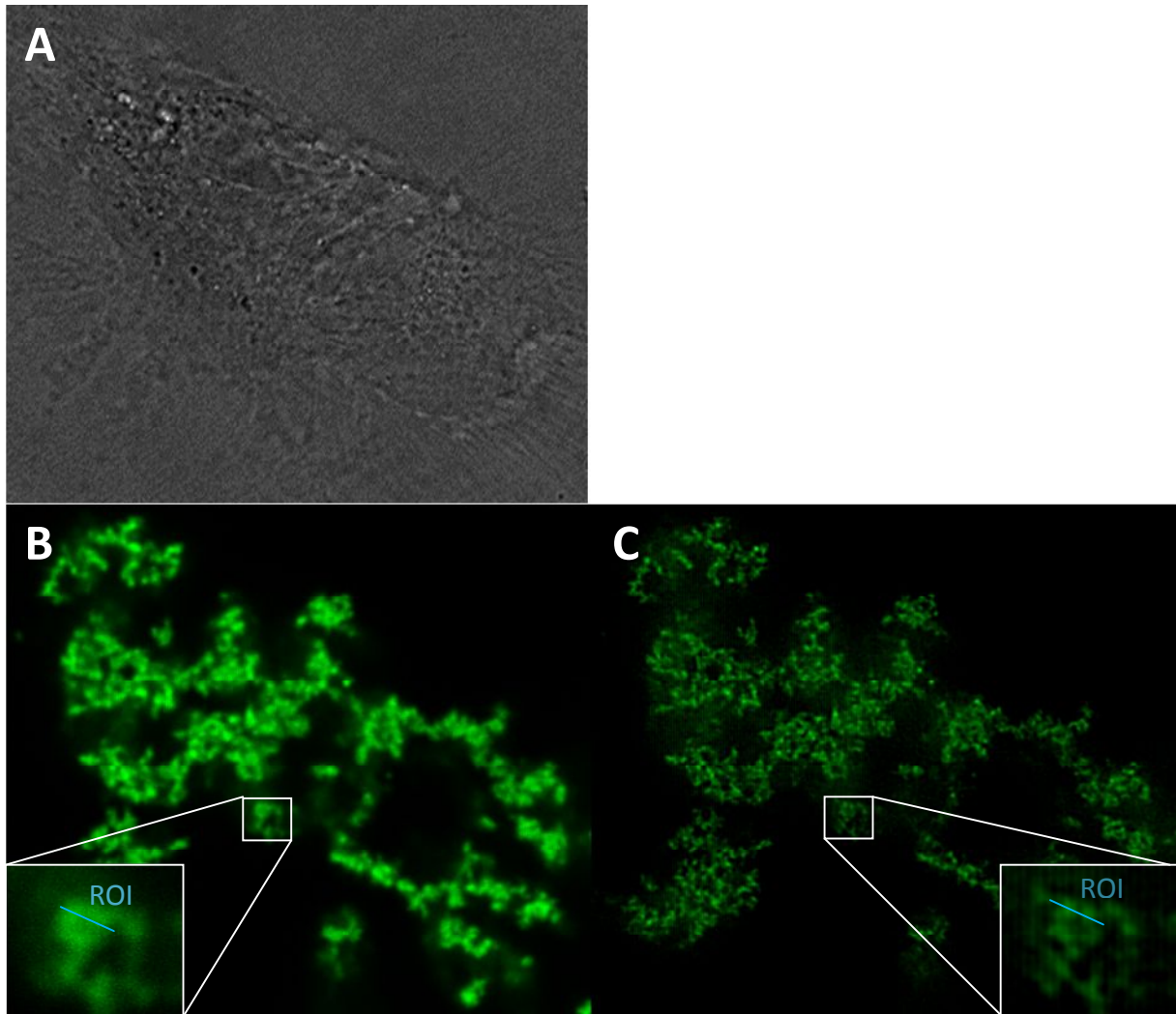


Abbildung 71: Vergleich eines CLSM-Bildes (B) und STED-Bildes (C) von derselben HeLa-Zelle (Durchlicht A) mit Biodipy-Nanopartikel (Grün). In den Ecken sind Ausschnittvergrößerungen dargestellt. ROI: Gesetzte Vermessungslinie (Region of interest).

Um den optischen Eindruck zu bestätigen, wurde eine Vermessung an einem größeren Punkt, der nach der STED-Aufnahme aus zwei Partikeln besteht, durchgeführt. Die Messung erfolgte entlang einer Linie (ROI), die in Abbildung 71 dargestellt ist. Es zeigte sich, dass im CLSM-Bild eine Unterscheidung der Partikel nicht möglich ist. Die Vermessung ergab einen großen Punkt von etwa 400 nm Größe (Abbildung 72 oben). Im STED jedoch lassen sich klar zwei getrennte Objekte ausmachen (Abbildung 72 unten). Es kann eine Größe von etwa 150 nm für jeden Punkt bestimmt werden, was gut zu der theoretischen Größe der Partikel von 139 nm passt.

Die STED-Mikroskopie ermöglicht so die detaillierte Darstellung von Nanopartikeln in Zellen. Im nächsten Schritt wird es das Ziel sein, diese Technik zu nutzen, um Kollokationen von Nanopartikel in lebenden Zellen über längere Zeiträume untersuchen zu können.

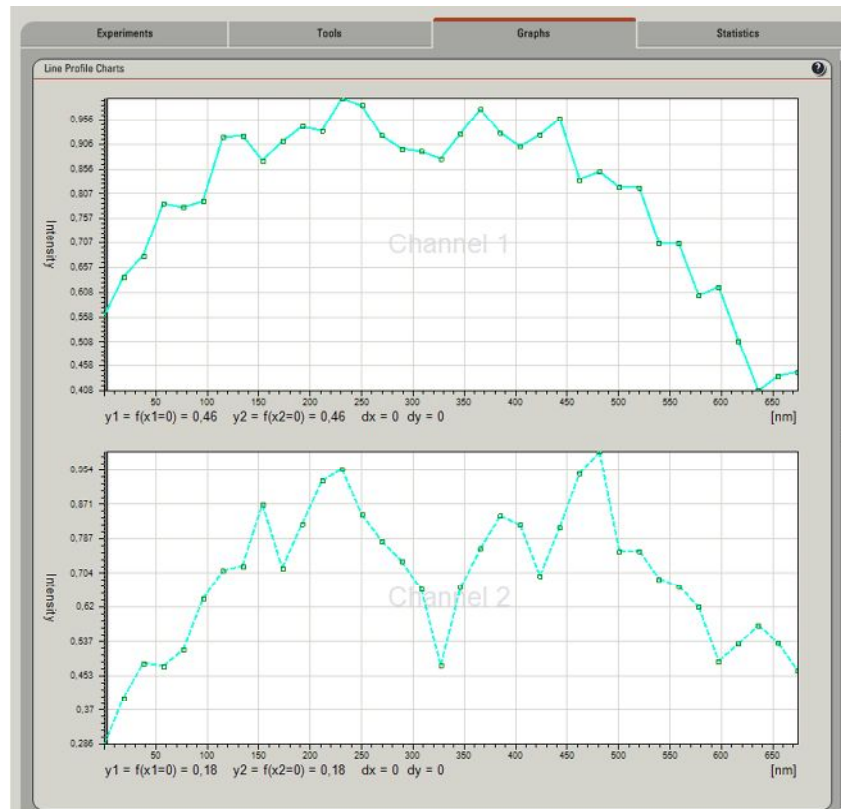


Abbildung 72: Beispiel der Diskriminierung von zwei Partikel im STED-Scan (unten, Channel 2) im Vergleich zum konfokalen Scan (oben, Channel 1).

7 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Interaktion von Polymer-Nanopartikel und Nanokapseln mit verschiedensten humanen Zellen.

Es wurde untersucht, welchen Einfluss das Polymer der Nanopartikel auf die Aufnahme in die Zelle hat^[147]. Dazu wurden Methacrylat-Partikel verwendet, die unterschiedliche Polymerseitenketten besitzen, sonst aber gleiche Partikeleigenschaften (Größe, Tensidbeladung) aufweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des T_g der Partikel einen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahme der Partikel besitzt. Partikel, deren Glaspunkt unterhalb der Zellinkubationstemperatur liegt, werden besser aufgenommen.

Der Einfluss der Funktionalisierung wurde an Phosphonatgruppen funktionalisierte Partikeln in der Zellkultur untersucht. Phosphonatgruppen sollen eine Bindung der Partikel an Titanoxidoberflächen ermöglichen. Die Aufnahme, Toxizität und deren Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen wurde in der Arbeit näher untersucht^[166]. MSC wurden in der Gegenwart dieser Partikel in die osteogene, chondrogene und adipogene Linie differenziert. Die Partikel wurden sehr gut in die Zellen aufgenommen und waren nicht toxisch. Der Nachweis der Differenzierung zeigte keinerlei Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens der MSC in Anwesenheit der Partikel. Auch zeigte diese Versuchsreihe, dass bei einer Partikel-Inkubationszeit von über einem Monat keinerlei toxische Nebenwirkungen auftreten und nach dieser Zeit noch immer Partikel in den Zellen nachweisbar sind.

Phosphonat-funktionalisierte Partikel mit einer höheren Phosphonatgruppendichte wurden zur Beschichtung von Titanoxid-Oberflächen herangezogen. Die Beschichtung einer Titanoberfläche mit diesen Partikeln ermöglichte ein sehr gutes Wachstum von MSC auf dieser Oberfläche. Beschichtete Flächen wurden bevorzugt. Hydroxylapatit-ummantelte Phosphonat-Partikel wurden auf Zellverträglichkeit getestet, da Hydroxylapatit eine weitere Steigerung der Bioverträglichkeit bewirken kann. Auch hier war kein negativer Einfluss auf MSC festzustellen.

Die weiteren Schritte der Untersuchungen werden zum Teil von Kooperationspartnern und auch noch zukünftig durchgeführt. Im nächsten Schritt ist das Ziel, abbaubare Kapseln und Partikel für diese Beschichtungen einzusetzen, die Wirkstoffe tragen. Diese sind Phosphonat-funktionalisiert und die Freisetzungen der Wirkstoffe, die sie enthalten sollen, werden erneut an MSC getestet. Osteoklasten wurden bereits mit unseren Kooperationspartnern mit phosphonat-funktionalisierten Partikeln untersucht. Die positiven Ergebnisse bilden die Grundlagen für den nächsten Schritt^[165]. Dabei ist die Verwendung von abbaubaren Kapseln geplant, die eine Phosphonatfunktionalisierung tragen und Bisphosphonate freisetzen, um damit die Aktivität der Osteoklasten hemmen. Die ersten Arbeiten hierzu haben bereits begonnen. Der letzte Schritt dieses Projekts wird es schließlich sein, alle gewonnenen Erfahrungen im Tiermodell mit Implantaten zu bestätigen.

Abbaubare Nanokapseln ermöglichen die Wirkstofffreisetzung in Zellen. Verschiedene Kapseln wurden in dieser Arbeit untersucht, besonders Kapseln aus PBCA^[153]. Sie enthielten fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die als Modell für eine später zu verwendende DNA- oder RNA-Beladung dienen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kapseln sehr gut in Zellen aufgenommen werden und im Gegensatz zu den oft gezeigten toxischen Effekten der PBCA-Partikel, keine Toxizität auf Zellen zeigten. Des Weiteren hat sich ergeben, dass diese Kapseln ihren Inhalt in Zellen freigeben können. Dies wurde im Besonderen für MSC bestätigt.

Somit ist es möglich, mit diesen Kapseln künftig DNA und RNA in Zellen einzuschleusen und freizusetzen, auch *in vivo*. Erste Versuche mit Kooperationspartnern laufen bereits. Weitere Anwendungen sind denkbar, z.B. weitere hydrophile Stoffe wie Proteine zu verkapseln und in Zellen freizusetzen.

Die Entdeckung, dass die in den Kapseln verwendeten CY5-markierten Oligonukleotide in der Lage sind Mitochondrien anzufärben, wurde mit einer kommerziellen Färbelösung verglichen. Es zeigte sich, dass eine Färbung mit CY5-markierten Oligonukleotiden zwar länger dauert, aber dafür über sehr viel längere Zeiten ohne negative Einflüsse für die Zelle angewendet werden kann.

Diese Methode eröffnet eine neue kostengünstige Alternative in dem sehr wichtig geworden

Bereich der Fluoreszenz Analyse von Zellen. Außerdem stellt sie eine gut verträgliche Methode dar, unproblematisch und nicht toxisch Mitochondrien über längere Zeiträume zu färben und zu beobachten. CY5-markierte Oligonukleotide bieten sich auch an, um die Freisetzung aus Kapseln in Zellen optisch verfolgen zu können.

8 Summary and Outlook

This thesis is dealing with the interaction of polymer nanoparticles and nanocapsules with different human cell lines.

The influence of the polymer of the nanoparticle with the uptake in the cell has been investigated^[147]. Therefore metacrylate nanoparticles were used, which have different side polymer side chains, but are equal in other particle characteristics (size, surfactant load). It was shown, that the influence of the T_g of the particles has an crucial influence on the cellular uptake of the particles. Particles with a glass transition point below the cell incubation temperature showed a better uptake.

The influence of functionalization was investigated with phosphonate functionalized particles in cell culture. Phosphonate groups should allow the binding of particles to titanium surfaces. The uptake, toxicity and the influence on the differentiation of stem cells was investigated closely in this thesis^[166]. MSC were differentiated in the presence of particles to the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage. The particles showed a good uptake in the cells and are not toxic. There was no influence on the differentiation potential of the MSC in presence of the particles. This experiment also showed no toxic influence of the particles after an incubation time of more than one month and also still the presents of these particles inside the cells after this time period.

Phosphonate functionalized nanoparticles with a higher phosphonate group density were used for coating of titanium oxide surfaces. The coating of the titanium surface with these particles facilitates a very good cell growth of MSC on this surface. Coated surfaces were preferred. Hydroxyapatite coated phosphonate particles were tested on cell compatibility, because Hydroxyapatite can support an increase of biocompatibility. Also in this case no negative influence on MSC was detected.

The next steps in this project that is also partially done by cooperation partners are ongoing and will still be done in the future. The next step will be the use of degradable capsules and particles for the coatings that bear active components. These will be phosphonate

functionalized and able to set free these active components and they will also be tested with MSC. Also osteoclasts were already tested by our cooperation partners with phosphonated particles. The positive results are the basics for the next steps^[165]. Here the use of degradable capsules are planned to inhibit osteoclast activity. The first studies have already started. The last step of this project will be to use the experience for in an animal model with implants.

Degradable capsules allow the disposal of active components in the cell. Different capsules we used in this thesis especially PBCA capsules^[153]. They contained fluorescent labeled oligonucleotides that were used as a model for DNA and RNA in the later application. It could be shown, that these capsules were efficiently take up by the cells and didn't show any toxic effect as PBCA particles in cells. It was also shown, that the PBCA capsules are able to release their load in cells. This was shown especially for MSC.

Therefore it is possible to use PBCA capsules for the delivery of DNA and RNA to cells, also *in vivo*. First experiments of cooperation partners are already in progress. Other application can also be the encapsulation and intracellular release of other hydrophilic substances like Proteins.

The discovery of mitochondria staining of CY5-labeled oligonucleotides was compared to commercial staining methods. Indeed the staining of CY5-labelled oligonucleotides took a little bit longer than the commercial one, but it could be used during a long time observation of cells without a negative influence on the cells.

This method created a new cost-efficient alternative in the growing important sector of fluorescence analysis of cells. In addition it is a good and easy method to stain mitochondria over long time periods without any toxic effects. Cy5-labeled Oligonucleotides are also first choice to show the release out of capsules in cells in an easy way.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Christopher A. Kenedi SRB, James W. Hendley II, and Peter H. Stauffer, „ :. Volcanic Ash Fall -- A "Hard Rain" of Abrasive Particles. 2000.
- [2] Roggensack K, Williams SN, Schaefer SJ, Parnell RA, Jr. Volatiles from the 1994 Eruptions of Rabaul: Understanding Large Caldera Systems. *Science*. 1996;273:490-3.
- [3] Tilling H, and Wright. Eruptions of Hawaiian Volcanoes: Past, Present, and Future: USGS Special Interest Publication; 1987.
- [4] Davies CN. Size, area, volume and weight of dust particles. *Ann Occup Hyg*. 1961;3:219-25.
- [5] Alexander J. Dust Particles. *Science*. 1932;75:194.
- [6] Dworkin. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. Berlin, Deutschland: Springer Verlag; 2006.
- [7] Ignjatovic J. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Aust Vet J*. 1995;72:40.
- [8] Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. 1985;229:1358-65.
- [9] Diven DG. An overview of poxviruses. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:1-16.
- [10] Klose T, Kuznetsov YG, Xiao C, Sun S, McPherson A, Rossmann MG. The three-dimensional structure of Mimivirus. *Intervirology*. 2010;53:268-73.
- [11] Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol*. 1990;71 (Pt 11):2483-501.
- [12] Ahlquist P. Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr Biol*. 2005;15:R465-7.
- [13] Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology*. 2010;7:11.
- [14] Budkowska A. Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV)--a new paradigm in virus-cell interaction. *Pol J Microbiol*. 2009;58:93-8.
- [15] Cockley KD, Rapp F. Complementation for replication by unrelated animal viruses containing DNA genomes. *Microbiol Rev*. 1987;51:431-8.
- [16] Cox NJ, Kendal AP. Replication of animal viruses in differentiating muscle cells: vaccinia and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1978;41:635-40.
- [17] Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2007;6:331-40.
- [18] BeruBe K, Balharry D, Sexton K, Koshy L, Jones T. Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:1044-50.

- [19] Boue A. Zur Geschichte der Anstrichstoffe auf Naturstein: Altertum und Antike. Farbe in der Steinrestaurierung 2000.
- [20] Zauberkunststücke mit Gold und Glas. In: Peter Göllitz DENC, Haymo Ross, editor. Presse-Mitteilung 2005.
- [21] Finkel P. Sonnenschutz. Kosmetik International. 2008;140-2.
- [22] Ziegler AS. [Nano-particles--pharmaceutical "dwarves" with know-how]. Med Monatsschr Pharm. 2008;31:455-66; quiz 67-8.
- [23] Croll TP. Enamel microabrasion: observations after 10 years. J Am Dent Assoc. 1997;128 Suppl:45S-50S.
- [24] Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, et al. Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. Journal of Nanomaterials. 2009;2009:1-10.
- [25] Rimondini L, Palazzo B, Iafisco M, Canegallo L, Demarosi F, Merlo M, et al. The Remineralizing Effect of Carbonate-Hydroxyapatite Nanocrystals on Dentine. Materials Science Forum. 2007;539-543:602-5.
- [26] Borowski A. Mini-Partikel im Essen - Rote Milch und Pizza Multi. Süddeutsche Zeitung 2006.
- [27] Umweltbundesamt. Nanotechnik: Chancen und Risiken für Mensch und Umwelt. Hintergrundpapier 2006.
- [28] Dubbert WuR, M. Nationale und internationale Aktivitäten zu den Chancen und Risiken der Nanotechnik im Umweltbereich. 2007. p. 20-3.
- [29] Nedopil AJ, Mandrussow LG, Daldrup-Link HE. Implantation of ferumoxides labeled human mesenchymal stem cells in cartilage defects. J Vis Exp. 2010.
- [30] Chan J, Menon JP, Mahajan R, Jandial R. In vivo imaging of cellular transplants. Adv Exp Med Biol. 2010;671:1-12.
- [31] Mailander V, Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Fuchs K, Wiesneth M, et al. Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents. Mol Imaging Biol. 2008;10:138-46.
- [32] Modo M, Roberts TJ, Sandhu JK, Williams SC. In vivo monitoring of cellular transplants by magnetic resonance imaging and positron emission tomography. Expert Opin Biol Ther. 2004;4:145-55.
- [33] Prashant C, Dipak M, Yang CT, Chuang KH, Jun D, Feng SS. Superparamagnetic iron oxide--loaded poly(lactic acid)-D-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate copolymer nanoparticles as MRI contrast agent. Biomaterials. 2010;31:5588-97.
- [34] Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. Eur Radiol. 2001;11:2319-31.
- [35] Muschter R. [Local treatment of prostate cancer using thermal-ablative energy]. Urologe A. 2009;48:729-39.

- [36] Latorre M, Rinaldi C. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia. *P R Health Sci J.* 2009;28:227-38.
- [37] Huang DM, Hung Y, Ko BS, Hsu SC, Chen WH, Chien CL, et al. Highly efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal stem cells: implication for stem cell tracking. *Faseb J.* 2005;19:2014-6.
- [38] Qi CM, Ma GS, Liu NF, Shen CX, Chen Z, Liu XJ, et al. Identification and differentiation of magnetically labeled mesenchymal stem cells in vivo in swines with myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2009;131:417-9.
- [39] Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:615-27.
- [40] Venkatraman SS, Ma LL, Natarajan JV, Chattopadhyay S. Polymer- and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:801-14.
- [41] Guhagarkar SA, Gaikwad RV, Samad A, Malshe VC, Devarajan PV. Polyethylene sebacate-doxorubicin nanoparticles for hepatic targeting. *Int J Pharm.* 2010.
- [42] Chen ZG. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 2010.
- [43] Chapiro A, Maeda N. Polymerisation Radiochimique Du Styrolene En Suspension Aqueuse. *J Chim Phys Pcb.* 1959;56:230-3.
- [44] Gunesch H, Schneide.la. A New Method for Kinetical Studies on Suspension Polymerisation. *Makromolekul Chem.* 1969;125:213-&.
- [45] Burkart Philipp GR. Grundlagen der makromolekularen Chemie. Braunschweig: Vieweg; 1976.
- [46] Landfester K, Bechthold N, Forster S, Antonietti M. Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization. *Macromol Rapid Comm.* 1999;20:81-4.
- [47] Landfester K. Miniemulsionspolymerisation und Struktur von Polymer- und Hybridnanopartikeln. *Angewandte Chemie.* 2009;121:4556-76.
- [48] Landfester K. Polyreactions in miniemulsions. *Macromol Rapid Comm.* 2001;22:896-936.
- [49] Musyanovych A, Rossmann R, Tontsch C, Landfester K. Effect of hydrophilic comonomer and surfactant type on the colloidal stability and size distribution of carboxyl- and amino-functionalized polystyrene particles prepared by miniemulsion polymerization. *Langmuir.* 2007;23:5367-76.
- [50] Holzapfel V, Musyanovych A, Landfester K, Lorenz MR, Mailander V. Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells. *Macromol Chem Phys.* 2005;206:2440-9.
- [51] Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials.* 2006;27:2820-8.
- [52] Ziegler A, Landfester K, Musyanovych A. Synthesis of phosphonate-functionalized polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles and their kinetic behavior in miniemulsion polymerization. *Colloid Polym Sci.* 2009;287:1261-71.

- [53] Paiphansiri U, Tangboriboonrat P, Landfester K. Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets. *Macromolecular Bioscience*. 2006;6:33-40.
- [54] Crespy D, Landfester K. Preparation of nylon 6 nanoparticles and nanocapsules by two novel miniemulsion/solvent displacement hybrid techniques. *Macromol Chem Phys*. 2007;208:457-66.
- [55] Allemann E, Leroux JC, Gurny R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv Drug Deliver Rev*. 1998;34:171-89.
- [56] Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev*. 2003;55:519-48.
- [57] Musyanovych A, Mailander V, Landfester K. Miniemulsion droplets as single molecule nanoreactors for polymerase chain reaction. *Biomacromolecules*. 2005;6:1824-8.
- [58] Grit Baier AM, Andreas Best, Steffen Lorenz, Volker Mailänder, and Katharina Landfester. DNA amplification via polymerase chain reaction inside miniemulsion droplets with subsequent poly(n-butylcyanoacrylate) shell formation and delivery of obtained capsules into HeLa cells. Mainz, germany: MPI for Polymer Research; 2010. p. 22.
- [59] Caruso F, Zelikin AN, Becker AL, Johnston APR, Turatti F, Wark K. PMSE 402-Encapsulation of DNA within degradable polymeric microcapsules. *Abstr Pap Am Chem S*. 2008;236:-.
- [60] Lorenz MR, Kohnle MV, Dass M, Walther P, Hocherl A, Ziener U, et al. Synthesis of fluorescent polyisoprene nanoparticles and their uptake into various cells. *Macromol Biosci*. 2008;8:711-27.
- [61] Musyanovych A, Schmitz-Wienke J, Mailander V, Walther P, Landfester K. Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. *Macromol Biosci*. 2008;8:127-39.
- [62] Weiss CK, Lorenz MR, Landfester K, Mailander V. Cellular uptake behavior of unfunctionalized and functionalized PBCA particles prepared in a miniemulsion. *Macromol Biosci*. 2007;7:883-96.
- [63] Dausend J, Musyanovych A, Dass M, Walther P, Schrezenmeier H, Landfester K, et al. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol Biosci*. 2008;8:1135-43.
- [64] Ko IK, Ziady A, Lu S, Kwon YJ. Acid-degradable cationic methacrylamide polymerized in the presence of plasmid DNA as tunable non-viral gene carrier. *Biomaterials*. 2008;29:3872-81.
- [65] Ma M, Li F, Yuan ZF, Zhuo RX. Influence of hydroxyl groups on the biological properties of cationic polymethacrylates as gene vectors. *Acta Biomater*. 2010;6:2658-65.
- [66] Weiss CK, Kohnle MV, Landfester K, Hauk T, Fischer D, Schmitz-Wienke J, et al. The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *Chemmedchem*. 2008;3:1395-403.
- [67] Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mader K, Muller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm*. 2000;196:245-9.
- [68] Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials*. 2006;27:2820-8.

- [69] Cserhati T, Forgacs E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ Int.* 2002;28:337-48.
- [70] Damge C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P. New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes.* 1988;37:246-51.
- [71] Fulzele SV, Satturwar PM, Dorle AK. Novel biopolymers as implant matrix for the delivery of ciprofloxacin: biocompatibility, degradation, and in vitro antibiotic release. *J Pharm Sci.* 2007;96:132-44.
- [72] Couvreur P, Fattal E, Andremont A, Chiannikulchai N, Benoit JP. [The use of nano-particles for the vectorization of antibiotic and antineoplastic drugs]. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 1988;143:378-88.
- [73] Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17:103-14.
- [74] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 1994;263:1600-3.
- [75] Jiao YY, Ubrich N, Hoffart V, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hoffman M, et al. Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28:1033-41.
- [76] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47:65-81.
- [77] Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat W, Hoffman M, Maincent P. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials.* 1996;17:2191-7.
- [78] Makino K, Arakawa M, Kondo T. Preparation and Invitro Degradation Properties of Polylactide Microcapsules. *Chem Pharm Bull.* 1985;33:1195-201.
- [79] Park TG. Degradation of Poly(D,L-Lactic Acid) Microspheres - Effect of Molecular-Weight. *J Control Release.* 1994;30:161-73.
- [80] Park TG. Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres - Effect of Copolymer Composition. *Biomaterials.* 1995;16:1123-30.
- [81] Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N, Qian R, et al. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials.* 1999;20:1057-62.
- [82] Kante B, Couvreur P, Duboiskrack G, Demeester C, Guiot P, Roland M, et al. Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles .1. Free Nanoparticles. *J Pharm Sci-U.S.* 1982;71:786-90.
- [83] Lherm C, Muller RH, Puisieux F, Couvreur P. Alkylcyanoacrylate Drug Carriers .2. Cytotoxicity of Cyanoacrylate Nanoparticles with Different Alkyl Chain-Length. *International Journal of Pharmaceutics.* 1992;84:13-22.
- [84] Guyette JP, Cohen IS, Gaudette GR. Strategies for regeneration of heart muscle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20:35-50.
- [85] Teo AK, Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem J.* 2010;428:11-23.
- [86] Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-64.

- [87] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*. 2005;310:1135-8.
- [88] Torres AJ, Wu M, Holowka D, Baird B. Nanobiotechnology and cell biology: micro- and nanofabricated surfaces to investigate receptor-mediated signaling. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:265-88.
- [89] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29:2941-53.
- [90] Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18:410-4.
- [91] Uchida M, Flenniken ML, Allen M, Willits DA, Crowley BE, Brumfield S, et al. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2006;128:16626-33.
- [92] Win KY, Feng SS. In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials*. 2006;27:2285-91.
- [93] Chawla JS, Amiji MM. Biodegradable poly(epsilon -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm*. 2002;249:127-38.
- [94] Veisoh O, Kievit FM, Gunn JW, Ratner BD, Zhang M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials*. 2009;30:649-57.
- [95] Jin S, Ye K. Nanoparticle-mediated drug delivery and gene therapy. *Biotechnol Prog*. 2007;23:32-41.
- [96] Kelly DJ, Jacobs CR. The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2010;90:75-85.
- [97] Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S58-65.
- [98] Nesselmann C, Ma N, Bieback K, Wagner W, Ho A, Konttinen YT, et al. Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *J Cell Mol Med*. 2008;12:1795-810.
- [99] GEK B. In: c_hueftprothese.jpg, editor.: Barmer GEK.
- [100] Tugulu S, Barbey R, Harms M, Fricke M, Volkmer D, Rossi A, et al. Synthesis of poly(methacrylic acid) brushes via surface-initiated atom transfer radical polymerization of sodium methacrylate and their use as substrates for the mineralization of calcium carbonate. *Macromolecules*. 2007;40:168-77.
- [101] Tugulu S, Harms M, Fricke M, Volkmer D, Klok HA. Polymer brushes as ionotropic matrices for the directed fabrication of microstructured calcite thin films. *Angew Chem Int Edit*. 2006;45:7458-61.
- [102] Kawaguchi H. [Bone fracture and the healing mechanisms. Fibroblast growth factor-2 and fracture healing]. *Clin Calcium*. 2009;19:653-9.
- [103] Evans CH. Gene therapy for bone healing. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e18.
- [104] Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;6:CD006950.
- [105] Zeller A, Musyanovych A, Kappl M, Ethirajan A, Dass M, Markova D, et al. Nanostructured Coatings by Adhesion of Phosphonated Polystyrene Particles onto Titanium Surface for Implant Material Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2010;2:2421-8.

- [106] Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys. 2008;473:132-8.
- [107] Ethirajan A, Landfester K. Functional hybrid materials with polymer nanoparticles as templates. Chemistry. 2010;16:9398-412.
- [108] [New data on poxviruses]. Biochimie. 1979;61:VII-XI.
- [109] Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. Scanning. 1988;10:128-38.
- [110] Kristin L. Hazelwood SGO, John D. Griffin, Christopher S. Murphy, Judith A. Cathcart, and Michael W. Davidson Introduction to Digital Imaging in Microscopy; Part II: Basic Microscopy Concepts. Hamamatsu.
- [111] Zeiss. Das konfokale Laser Scanning Mikroskop im Überblick.
- [112] Klar TA, Hell SW. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. Opt Lett. 1999;24:954-6.
- [113] Rittweger E, Han KY, Irvine SE, Eggeling C, Hell SW. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. Nat Photon. 2009;3:144-7.
- [114] Leica. Leica TCS STED CW. 2009.
- [115] Schubbe S, Cavalius C, Schumann C, Koch M, Kraegeloh A. STED Microscopy to Monitor Agglomeration of Silica Particles Inside A549 Cells. Adv Eng Mater. 2010;12:417-22.
- [116] Lauterbach M. Darstellung von Anregungsfokus (links), Ausschaltfokus (mitte) und dem verbleibenden Fluoreszierenden Bereich (rechts) in einem STED Mikroskop. In: STED_Mikroskop_PSFs.jpg, editor.: de.wikipedia; 2010.
- [117] Zenka D. TEAM Project Achieves Microscopy Breakthrough- 0.5 Angstrom Imaging Milestone Reveals the Smallest Details Ever Seen by Electron Microscopy FEI Company; 2007
- [118] Flegler H, Klomparens. Elektronenmikroskopie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.
- [119] Fakultät (Nat-Fak-II) M, FAU Erlangen Transmissionselektronenmikroskop (TEM). 2006.
- [120] Flegler S. N. HJWuKKL. Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Heidelberg - Berlin - Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.
- [121] Ludwig Reimer GP. Raster - Elektronenmikroskopie. . Berlin: Springer; 1999.
- [122] Gallego-Urrea JA, Tuoriniemi J, Pallander T, Hasselov M. Measurements of nanoparticle number concentrations and size distributions in contrasting aquatic environments using nanoparticle tracking analysis. Environ Chem. 2009;7:67-81.
- [123] NanoSight. How to make Concentration Measurements using NanoSight LM Series Instruments. In: Ltd N, editor. Amesbury, Wiltshire, SP4 7RT, UK: NanoSight Ltd; 2009.
- [124] Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. J Microbiol Methods. 2000;42:97-114.

- [125] Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev.* 1996;60:641-96.
- [126] Steen HB, Lindmo T. Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. *Science.* 1979;204:403-4.
- [127] Partec. CyFlow® ML. Partec.
- [128] Bob D. A diagram of a Czerny-Turner monochromator. In: Czerny-turner.png, editor.: en.wikipedia; 2004.
- [129] Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit.* 2007;37:120-6.
- [130] Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum.* 2004.
- [131] Ygonaar. Topological formula of the SYBR green I ([2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium]+). In: SYBR_green_I_(topological_formula).png, editor. ACD/ChemStetch Freeware: wikimedia.org; 2006.
- [132] Dean Fraga TM, Steven Fenster. Real-Time PCR. *Current Protocols.* 2008.
- [133] Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 2009;46:277-84.
- [134] Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 2010;127:1-8.
- [135] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51:1409-16.
- [136] Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983;43:1809-18.
- [137] Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett.* 2006;580:2294-300.
- [138] Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280:36529-40.
- [139] Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 1977;19:621-6.
- [140] Koefler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 1980;56:344-50.
- [141] Wobus AM. *Stem Cells*: Springer; 2008.
- [142] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
- [143] Vcell. Zell Zyklus. In: zell_zyklus.gif, editor. Scheyern: S+P Media AG

Schyrenplatz 3

85298 Scheyern; 2002.

[144] Kastrop L. Fluorescent Dyes Used in STED Microscopy. Göttingen: Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie; 2010.

[145] Walther P, Ziegler A. Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water. *J Microsc.* 2002;208:3-10.

[146] Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood.* 1996;87:2244-51.

[147] Lorenz S, Hauser CP, Autenrieth B, Weiss CK, Landfester K, Mailänder V. The Softer and More Hydrophobic the Better: Influence of the Side Chain of Polymethacrylate Nanoparticles for Cellular Uptake. *Macromol Biosci.* 2010.

[148] Howe CJ, LaHair MM, Robinson PJ, Rodriguez-Mora O, McCubrey JA, Franklin RA. Models of anergy in the human Jurkat T cell line. *Assay and drug development technologies.* 2003;1:537-44.

[149] Chen ZJ, Lohr A, Saha-Moller CR, Wurthner F. Self-assembled pi-stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features. *Chemical Society Reviews.* 2009;38:564-84.

[150] Wurthner F. Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. *Chem Commun.* 2004:1564-79.

[151] Gardella JA, Novak FP, Hercules DM. STATIC SECONDARY ION MASS-SPECTROMETRY FOR STUDY OF SURFACE HYDROLYSIS OF POLY(TERT-BUTYL METHACRYLATE). *Analytical Chemistry.* 1984;56:1371-5.

[152] Mailänder V, Lorenz Myriam R, Holzapfel V, Musyanovych A, Fuchs K, Wiesneth M, et al. Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents. *Mol Imaging Biol FIELD Full Journal Title:Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging.* 2008;10:138-46.

[153] Steffen Lorenz GB, Anna Musyanovych, Stephanie Tomcin, Katharina Landfester and Volker Mailänder. Uptake of PBCA nanocapsules in different cell lines and their release behavior of Cy5-labeled oligonucleotides. Mainz, Germany: MPI for Polymer Research; 2010.

[154] Singer MM, Tjeerdema RS. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1993;133:95-149.

[155] Scherer D, Robinson JR, Kreuter J. Influence of Enzymes on the Stability of Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics.* 1994;101:165-8.

[156] Poot M, Zhang YZ, Kramer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44:1363-72.

[157] Howard PH, Jr., Wilson SB. Effects of the cyanine dye 3,3'-dipropylthiocarbocyanine on mitochondrial energy conservation. *Biochem J.* 1979;180:669-72.

[158] Liu Z, Bushnell WR, Brambl R. Potentiometric cyanine dyes are sensitive probes for mitochondria in intact plant cells : kinetin enhances mitochondrial fluorescence. *Plant Physiol.* 1987;84:1385-90.

- [159] Poot MM, Fei. Cyanine dyes that stain cells and mitochondria. In: *Molecular Probes I*, editor. <http://www.patentstorm.us/patents/6291203/fulltext.html>. US: Molecular Probes, Inc.; 2001.
- [160] Rhee WJ, Bao G. Slow non-specific accumulation of 2'-deoxy and 2'-O-methyl oligonucleotide probes at mitochondria in live cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e109.
- [161] Santangelo PJ, Nitin N, Bao G. Direct visualization of mRNA colocalization with mitochondria in living cells using molecular beacons. *J Biomed Opt.* 2005;10:44025.
- [162] Tizazu G, Adawi AM, Leggett GJ, Lidzey DG. Photopatterning, etching, and derivatization of self-assembled monolayers of phosphonic acids on the native oxide of titanium. *Langmuir.* 2009;25:10746-53.
- [163] Paiphansiri U, Dausend J, Musyanovych A, Mailander V, Landfester K. Fluorescent Polyurethane Nanocapsules Prepared via Inverse Miniemulsion: Surface Functionalization for Use as Biocarriers. *Macromolecular Bioscience.* 2009;9:575-84.
- [164] Tiarks F, Landfester K, Antonietti M. One-step preparation of polyurethane dispersions by miniemulsion polyaddition. *J Polym Sci Pol Chem.* 2001;39:2520-4.
- [165] Tautzenberger A, Kreja L, Zeller A, Lorenz S, Walther P, Schrezenmeier H, et al. Direct and indirect effects of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on human osteoclast formation and activity. 2010.
- [166] Tautzenberger A, Lorenz S, Kreja L, Zeller A, Musyanovych A, Schrezenmeier H, et al. Effect of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials.* 2009.
- [167] Shah BS, Clark PA, Moioli EK, Stroschio MA, Mao JJ. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett.* 2007;7:3071-9.
- [168] Liu HM, Wu SH, Lu CW, Yao M, Hsiao JK, Hung Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles improve magnetic labeling efficiency in human stem cells. *Small.* 2008;4:619-26.
- [169] Hsiao JK, Tsai CP, Chung TH, Hung Y, Yao M, Liu HM, et al. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system of gadolinium for effective human stem cell tracking. *Small.* 2008;4:1445-52.
- [170] Guo H, Su J, Wei J, Kong H, Liu C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5:268-78.
- [171] Saldana L, Sanchez-Salcedo S, Izquierdo-Barba I, Bensiamar F, Munuera L, Vallet-Regi M, et al. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 2009;5:1294-305.
- [172] Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:11613-8.
- [173] Jensen KD, Nori A, Tijerina M, Kopeckova P, Kopecek J. Cytoplasmic delivery and nuclear targeting of synthetic macromolecules. *J Control Release.* 2003;87:89-105.
- [174] Gupta AK, Curtis AS. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:493-6.

- [175] Chung TH, Wu SH, Yao M, Lu CW, Lin YS, Hung Y, et al. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28:2959-66.
- [176] Schofer MD, Fuchs-Winkelmann S, Kessler-Thones A, Rudisile MM, Wack C, Paletta JR, et al. The role of mesenchymal stem cells in the pathogenesis of Co-Cr-Mo particle induced aseptic loosening: an in vitro study. *Biomed Mater Eng*. 2008;18:395-403.
- [177] Okafor CC, Haleem-Smith H, Laqueriere P, Manner PA, Tuan RS. Particulate endocytosis mediates biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris. *J Orthop Res*. 2006;24:461-73.
- [178] Hsiao JK, Chu HH, Wang YH, Lai CW, Chou PT, Hsieh ST, et al. Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling. *NMR Biomed*. 2008;21:820-9.
- [179] Rohanizadeh R, Chung K. Hydroxyapatite as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Oral Implantol*. 2010.
- [180] Almora-Barrios N, de Leeuw NH. A density functional theory study of the interaction of collagen peptides with hydroxyapatite surfaces. *Langmuir*. 2010;26:14535-42.
- [181] Niwa S. Recent trends and development of biomaterials for artificial bone. *Mater Jpn*. 2004;43:186-92.
- [182] Niinomi M. Metallic biomaterials. *Journal of Artificial Organs*. 2008;11:105-10.
- [183] Goto T, Yoshinari M, Kobayashi S, Tanaka T. The initial attachment and subsequent behavior of osteoblastic cells and oral epithelial cells on titanium. *Biomed Mater Eng*. 2004;14:537-44.
- [184] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29:3822-35.
- [185] Kim TI, Jang JH, Kim HW, Knowles JC, Ku Y. Biomimetic approach to dental implants. *Curr Pharm Des*. 2008;14:2201-11.
- [186] Sorensen HN, Norrheim L, Spydevold O, Gautvik KM. Uptake and receptor binding of dexamethasone in cultured 7800 C1 hepatoma cells in relation to regulation of cell growth and peroxisomal beta-oxidation. *Int J Biochem*. 1990;22:1171-7.
- [187] Howell GM, Po C, Lefebvre YA. Identification of dexamethasone-binding sites on male-rat liver plasma membranes by affinity labelling. *Biochem J*. 1989;260:435-41.
- [188] Cabrelle A, Maschio N, Carraro S, Frezzato F, Binotto G, Gattazzo C, et al. Apoptotic effect of cyclosporin a and dexamethasone in malignant cells of patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2009;23:239-50.
- [189] Nieuwenhuis B, Luth A, Kleuser B. Dexamethasone protects human fibroblasts from apoptosis via an S1P3-receptor subtype dependent activation of PKB/Akt and Bcl XL. *Pharmacol Res*. 2010;61:449-59.
- [190] Gray JW, Dolbeare F, Pallavicini MG, Beisker W, Waldman F. Cell-Cycle Analysis Using Flow-Cytometry. *International Journal of Radiation Biology*. 1986;49:237-55.
- [191] Ormerod MG, Kubbies M. Cell-Cycle Analysis of Asynchronous Cell-Populations by Flow-Cytometry Using Bromodeoxyuridine Label and Hoechst-Propidium Iodide Stain. *Cytometry*. 1992;13:678-85.

- [192] Latt SA, George YS, Gray JW. Flow Cytometric Analysis of Bromodeoxyuridine-Substituted Cells Stained with 33258 Hoechst. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1977;25:927-34.
- [193] Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*. 2008;7:189-203.
- [194] Olszewski U, Hamilton G. Mechanisms of cytotoxicity of anticancer titanocenes. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010;10:302-11.
- [195] Li N, Fan LL, Sun GP, Wan XA, Wang ZG, Wu Q, et al. Paeonol inhibits tumor growth in gastric cancer in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol*. 2010;16:4483-90.
- [196] Mengual Gomez DL, Belaich MN, Rodriguez VA, Ghiringhelli PD. Effects of Fetal Bovine Serum deprivation in cell cultures on the production of Anticarsia gemmatalis Multinucleopolyhedrovirus. *BMC Biotechnol*. 2010;10:68.
- [197] Shushan Lim L, Huimei Hong F, Kunarso G, Stanton LW. The Pluripotency Regulator Zic3 is a Direct Activator of the Nanog Promoter in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2010.
- [198] Fürstenberg A. Einfluß des Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS-398 auf Proliferation und Apoptose von Ovarialkarzinomzelllinien. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin; 2004.
- [199] Laurent M, Johannin G, Gilbert N, Lucas L, Cassio D, Petit PX, et al. Power and Limits of Laser-Scanning Confocal Microscopy. *Biology of the Cell*. 1994;80:229-40.
- [200] Kalendo GS, Savinov AG, Demidova NI, Serebriakov NG. [Changes in the self ultraviolet fluorescence of HeLa cells undergoing ionizing irradiation]. *Tsitologija*. 1984;26:1048-53.

10 Danksagung

Als erstes gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Katharina Landfester für die interessanten Themen und die Möglichkeit meine Dissertation in der Organischen Chemie III der Universität Ulm und im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz anfertigen zu dürfen. Ich danke ihr sehr für die kompetente Betreuung und die stets gute und fachliche Diskussion.

Frau Prof. Dr. Tanja Weil danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu Übernehmen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an PD Dr. med. Volker Mailländer, meinen Arbeitsgruppenleiter und Betreuer. Vielen Dank für die Betreuung, ausgiebige Diskussionen und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und war stets an meinen Ideen interessiert.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Schrezenmeier für die Möglichkeit den ersten Teil der Arbeit am Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm gGmbH (IKT Ulm) anzufertigen.

Ich ganz großes Dankeschön geht an das Zelllabor hier am MPI für Polymerforschung, an Daniela, Ivonne, Melanie, Simone, Anita, Jens, Niklas und Steffi. Danke für die schöne Zeit und die tolle Arbeitsatmosphäre. Es war immer schön mit Euch zu arbeiten und ich werde es vermissen.

Ein großes Dankeschön geht auch an die chemischen Kollegen, mit denen die tollen Projekte erst möglich wurden. Hier danke ich speziell Grit, Anke und Christoph. Danke, dass ich auch mit chemischen Fragen immer zu Euch kommen konnte.

Ein liebes Dankeschön geht auch nach Ulm an Karin, Gisela, Thomas und Markus, für die schöne Zeit, an die ich stets gern zurückdenke und ihre kompetente Hilfe.

Vielen Dank auch alle Projektpartner in Ulm. Danke, dass trotz der Distanz immer alles super funktioniert hat.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Mitpendler zwischen Mainz und Ulm: Grit, Eugen, Anika, Markus, Martin. Vielen Dank an die Fahrer, dass Ihr mich immer sicher gefahren habt und die Fahrt immer lustig und unterhaltsam war.

Vielen Dank auch an alle Freunde und Kollegen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung und der Organischen Chemie III der Universität Ulm. Vielen Dank für die schöne Zeit mit Euch.

Ich danke außerdem meinen Freunden, die meinen Wochenenden in Ulm immer neue Abwechslungen und Freude brachten. Vielen Dank Karin, Wolfgang, Evi, Frank und Frank. Die lustige Zeit mit Euch war stets eine tolle Abwechslung.

Viele Grüße und vielen Dank an meine Schwiegereltern. Vielen Dank für die stets nette Zeit an den Wochenenden bei Euch.

Ein großer Dank und ganz lieber Gruß gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Danke für Eure Unterstützung, Hilfe, Trost und Rat. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da wart und an mich geglaubt habt.

An ganz lieber und besonderer Dank geht zum Schluss an meine Frau Myriam. Danke, dass Du immer für mich da warst und mit mir durch diese schwierige Zeit gegangen bist. Danke für Deine Unterstützung, Deine Hilfe, Deine Geduld und Hilfsbereitschaft.

11 Lebenslauf

Steffen Lorenz

Diplom-Biologe
Meisenweg 21
89160 Dornstadt



Persönliches

Geboren am 18. April 1974
in Neustadt a.d. Aisch
verheiratet

Berufliche Erfahrung

2005 – 2007 **Universität Ulm, Abt. Physiologische Chemie**
Wissenschaftlicher Angestellter
2003 – 2004 **Universitätsklinik Ulm, Abt. Virologie**
Wissenschaftlicher Angestellter

Studium und Ausbildung

2007 – heute **Max-Planck-Institut für Polymerforschung**
Promotion zum Dr. rer. nat.
Thema der Doktorarbeit:
Interaktion von Nanopartikeln mit immortalisierten Zelllinien und Stammzellen

1994 – 2002 **Studium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen**
Studiengang: Diplom Biologie
Thema der Diplomarbeit:
Funktionelle Interaktion zwischen dem viralen Pathogenesefaktor Nef und dem Transmembranprotein des Affen-Immundefizienzvirus SIVmac

1983 – 1994 **Georg-Wilhelm-Steller Gymnasium, Bad Windsheim**

1981 – 1983 **Hermann Delp Grundschule, Bad Windsheim**

1980 – 1981 **Grundschule I, Bad Windsheim**

12 Publikationen

- Veröffentlichungen:** Pöhlmann S, Davis C, Meister S, Leslie GJ, Otto C, Reeves JD, Puffer BA, Papkalla A, Krumbiegel M, Marzi A, Lorenz S, Münch J, Doms RW, Kirchhoff F. *Amino acid 324 in the simian immunodeficiency virus SIVmac V3 loop can confer CD4 independence and modulate the interaction with CCR5 and alternative coreceptors.* J Virol. 2004 Apr;78(7):3223-32.
- Tautzenberger A*, Lorenz S*, Kreja L, Zeller A, Musyanovych A, Schrezenmeier H, Landfester K, Mailänder V, Ignatius A. *Effect of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on mesenchymal stem cell differentiation.* Biomaterials. 2010 Mar;31(8):2064-71. (*Equally contributed work)
- Lorenz S, Hauser CP, Autenrieth B, Weiss CK, Landfester K, Mailänder V. *The softer and more hydrophobic the better: Influence of the side chain of polymethacrylate nanoparticles for cellular uptake* Macromol Biosci. 2010 Jun 22. [Epub ahead of print]
- Baier G, Musyanovych A, Lorenz S, Best A, Mailänder V, Landfester K. *DNA amplification via polymerase chain reaction inside miniemulsion droplets with subsequent poly(n-butylcyanoacrylate) shell formation and delivery of obtained capsules into HeLa cells.* In preparation.
- Wohnhaas Ch, Turshatov A, Mailänder V, Lorenz S, Balushev S, Miteva T and Landfester K
Annihilation Upconversion in HeLa Cells: Embedding in Polymeric Nanocapsules
Submitted to Angewandte Chemie.
- Tautzenberger A, Kreja L, Zeller A, Lorenz S, Walther P, Schrezenmeier H, Mailänder V, Landfester K, Ignatius A
Direct and indirect effects of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on human osteoclast formation and activity
Submitted to Biomaterials; accepted.
- Lorenz S, Tomcin S, Mailänder V
Staining of Mitochondria with cy5-labeled oligonucleotides for long term microscopy studies
In Preparation.

Poster:

Lorenz S, Ziegler A, Baumann D, Musyanovych A, Landfester K, Mailänder V. *Interaction of stem cells with functionalized nanoparticles for drug delivery in hard tissue implantation*

MPIP Naurod Tagung im Wilhelm-Kempf-Haus in Naurod, 2008.

Lorenz S, Baumann D, Brüstle I, Ziegler A, Musyanovych A, Tautzenberger A, Landfester K and Mailänder V. *Interaction of stem cells with functionalized nanoparticles for drug delivery*

Symposium „Polymer Research: Basic Science for Future Challenges“, MPI für Polymerforschung, Mainz, 2009.

Ziegler A, Lorenz S, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K. *Phosphonated Polymeric Nanoparticles and their Interaction with Stem Cells for Drug Delivery in Hard Tissue Implantation*

Forschungstag 2009, Landesstiftung Baden-Württemberg, Stuttgart, 2009.

Lorenz S, Zeller A, Musyanovych A, Tautzenberger A, Landfester K, Mailänder V. *Effect of functionalized fluorescence-labeled nanoparticles on mesenchymal stem cell differentiation.*

3rd European Conference for Clinical Nanomedicine, Basel, 2010.

13 Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von November 2007 bis September 2008 in der Abteilung Organische Chemie III der Universität Ulm und im Zeitraum von September 2008 bis November 2010 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere erstellt.

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den 22.11.2010

.....

Vorname Nachname / Unterschrift