

Einfluss verschiedener nanopartikulärer Systeme auf die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Biologie

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz

Jens-Michael Cramer

geb. am 01.10.1981 in Minden

Mainz 2012

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



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2013

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	3
2.1	Synthese von Nanokapseln und Nanopartikel	3
2.1.1	Miniemulsion	3
2.1.2	Modifizierte Formen der Miniemulsion	5
2.1.3	Modifizierung der Nanosphären	6
2.1.4	Funktionalisierung	7
2.1.5	Polyethylenglykol (PEG)	10
2.1.6	Formgebung	11
2.2	Aufnahme von Nanokapseln und Nanopartikel	13
2.2.1	Die Zellmembran	13
2.2.2	Zelluläre Transportmechanismen	15
2.2.3	Einfluss der Nanopartikel- und Nanokapselbeschaffenheit auf die Zellaufnahme	17
2.2.4	Protein-Corona	19
2.2.5	EPR-Effekt	21
2.2.6	Mechanismen von Nanopartikel-Toxizität	22
3	Methoden	25
3.1	Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser	25
3.2	Durchflusszytometrie	28
3.3	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop	29
4	Material und Durchführung	32
4.1	Material	32
4.1.1	Geräte	32
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	32
4.1.3	Reagenzien	33
4.1.4	Zelllinien	33
4.2	Durchführung	35
4.2.1	Zellkultur	35
4.2.2	Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser	35

4.2.3	Durchflusszytometrie	38
4.2.4	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop.....	40
5	Ergebnisse und Diskussion	41
5.1	Allgemeine Parameter, die die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln beeinflussen	42
5.1.1	Die Materialalterung von PLLA-Partikel und deren Einfluss auf die Aufnahme in Zellen.....	42
5.1.2	Einfluss des FCS-Gehalts des Zellmediums auf die Zellaufnahme von PMMA-Partikeln.....	46
5.2	Zellaufnahme und Zytotoxizität von mit innovativen Tensiden stabilisierte Nanopartikel.....	50
5.2.1	Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel und deren Einfluss auf die Zellaufnahme und Zytotoxizität	50
5.2.2	Biokompatible, durch HPMA-LMA-Copolymere stabilisierte Polystyrol- und PLLA-Partikel.....	61
5.3	Zelle-Nanopartikel-Interaktionen und Zytotoxizität von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Formen und Materialeigenschaften.....	67
5.3.1	Elongierte und sphärische Nanopartikel	67
5.3.2	Kristalline Nanopartikel	78
5.4	Nanosysteme mit reduzierter zelluläre Aufnahme	87
5.4.1	PEGylierung von Polystyrolpartikel, Modifizierung mit verschiedenen Tensiden und der Einfluss auf die zelluläre Aufnahme	87
5.4.2	Biologisch abbaubare Nanokapseln aus vernetzten Biopolymeren (Proteine, ssDNA).....	106
5.5	Vergleichende Analyse der Nanopartikel-Zellaufnahme und Zytotoxizität	115
5.5.1	Ergebnisse der vergleichenden Analyse.....	115
6	Zusammenfassung	120
7	Summary	124
8	Anhang	127
8.1	Übersicht über die für die vergleichende Analyse eingesetzten Nanopartikeln.....	127
9	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	131
10	Literatur	135
11	Danksagung	152

12 Lebenslauf	153
13 Veröffentlichungen	154
13.1 Publikationen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
13.2 Poster.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14 Erklärung	155

1 Einleitung

„Heilsame Zwerge. Mediziner nutzen ultrakleine Nanoteilchen zu neuartigen Therapien – auch gegen Krebs“ konnte dem Magazin FOCUS (FOCUS Nr. 5, 2007) entnommen werden. Nicht nur FOCUS, sondern auch etliche andere Medien rückten in den letzten Jahren die Präsenz der Nanopartikel und -kapseln als Trägersysteme für eine zielgerichtete Therapie, bezeichnet als „*Targeted-Drug-Delivery*“-Systeme, immer mehr in den Vordergrund. Dieser Umstand verdeutlicht die Aktualität der Forschung im Bereich der Nanomedizin, einem relativ jungen Forschungszweig der Bionanotechnologie. Mit Hilfe der entsprechend funktionalisierten Nanopartikel und -kapseln lassen sich pharmazeutische Wirkstoffe direkt am Zielort freisetzen. Dabei besteht die Hoffnung, dank der zielgerichteten Bekämpfung pathogener Gewebsveränderungen, die Nebenwirkungen herkömmlicher Zytostatika bzw. die Gesamtbelastung für den Organismus zu vermeiden oder mindestens stark zu reduzieren. Nanopartikel Systeme als Arzneistoffträger werden zunehmend seit Mitte der 70er Jahre erforscht und in der Praxis getestet. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte Hitzetherapie zur Bekämpfung von beispielsweise Prostatakrebs. Dabei spielt die passive Anreicherung von Substanzen in pathogenem Gewebe durch in den Tumor injizierte Nanopartikel eine wichtige Rolle. Diese Nanopartikel können mittels elektromagnetischer Energie zum Schwingen und somit zur Erzeugung von Hitze angeregt werden. Mittels der erzeugten Hitze wird das krankhafte Gewebe gezielt abgetötet. Dennoch sind noch viele grundlegende Fragen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Nanopartikel bzw. -kapseln und Zellen offen: Wie müssen die Nanosphären bzw. deren Oberflächen beschaffen sein, um bevorzugt von bestimmten Zellen aufgenommen zu werden? Besteht die Möglichkeit, dass Nanopartikel und –kapseln unerwünschte toxische Reaktionen in Zellen auslösen? Welche Nanomaterialien zeigen eine zytotoxische Wirkung? Welche gegenseitigen Beeinflussungen existieren zwischen Zellen und Nanopartikeln? Die Kenntnis der biologischen Wirkung von Nanopartikeln und -kapseln hilft, potenzielle Schadensfälle ausschließen und ggf. geeignete Gegenmaßnahmen ergreifen zu

können. Zu guter Letzt gilt es zudem, die Frage zu beantworten, ob und wie eine zielgerichtete Applikation funktionieren kann.

Ziel dieser Dissertation war es, die Wechselwirkungen unterschiedlich modifizierter Nanopartikel, -kapseln mit verschiedenen Zelllinien zu untersuchen. Bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt sind die Einflüsse von Material, Form, Oberflächenfunktionalisierung und der während der Herstellung verwendeten Substanzen, wie z.B. das Tensid, auf die zelluläre Aufnahme. Weiterhin ist das Wissen um zytotoxische Einflüsse der zur Synthese von Nanosphären eingesetzten Materialien insofern wichtig, dass sie während der nachfolgenden Synthesen vermieden oder verbessert werden können. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Modifikationen von Nanopartikeln und -kapseln auf die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität. Um diese Frage zu lösen, wurden die Parameter systematisch während der Herstellung der Nanosphären variiert, so dass die beobachteten Effekte auf die Veränderung einer Eigenschaft zurückgeführt werden können. In der vorliegenden Arbeit werden die einzelnen Parameter nacheinander vorgestellt und ihre Einflüsse auf die Nanopartikel-Zelle-Interaktionen untersucht. Zunächst wird auf allgemeine Parameter wie Materialalterung und der Einfluss der die Nanopartikel umgebenden Proteinhülle eingegangen. Anschließend werden Parameter wie die Stabilisierung der Nanopartikel mit innovativen Monomeren und die Form, sowie die Oberfläche der Nanopartikel in den Vordergrund gerückt. Den Abschluss der Zelluntersuchungen bildet die Analyse von Nanosphären mit einer reduzierten zellulären Aufnahme. Gerade solche Nanosphären können für spätere gezielte Modifikationen von großem Interesse sein. Für eine gute Vergleichbarkeit der Studien wurden zwei, für Zellstudien häufig verwendete Zelllinien, HeLa-Zellen und hMSCs (human mesenchymal stem cells), eingesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses kristalliner Nanopartikel auf die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität wurden zusätzlich humane Osteoblasten SaOs-2 auf Grund deren bekannte Präferenz zu kristallinen Oberflächen [1] eingesetzt. Die Analysen erfolgten mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie.

2 Theorie

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Synthese und Modifikation von Nanopartikeln und -kapseln vorgestellt. Anschließend wird auf den Aufbau der Zellmembran eingegangen und die damit verbundenen zellulären Mechanismen beschrieben.

2.1 Synthese von Nanokapseln und Nanopartikel

Die Herstellung von Nanopartikeln und -kapseln kann auf mehreren Wegen erfolgen. Für die vorliegende Arbeit wurden alle Nanopartikel und -kapseln mittels Miniemulsionspolymerisation und der Lösemittelverdampfungs-technik aus Miniemulsions-Tröpfchen hergestellt. Die Prinzipien dieser Techniken werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

2.1.1 Miniemulsion

Das Prinzip der Miniemulsionstechnik wurde erstmalig von *Ugelstad et al.* im Jahre 1973 publiziert [2]. Seitdem wurde die Technik zur Herstellung von Partikeln unterschiedlicher Größe optimiert und ermöglicht somit eine enorme Variabilität in der Herstellung und Funktionalisierung von Nanopartikeln und -kapseln. Bei der Herstellung von Nanopartikeln mit dem Miniemulsionsverfahren werden zunächst zwei nicht mischbare Phasen, eine kontinuierliche Phase (Phase II) und eine disperse Phase (Phase I), in einem Gefäß vorgelegt (siehe Abbildung 1). In der kontinuierlichen Phase befindet sich stets das für die Stabilisierung der Partikel vorgesehene Tensid. In der dispersen Phase hingegen befindet sich das Monomer, das osmotische Reagenz und gegebenenfalls die einzubettenden Farb- oder Wirkstoffe. Nach dem Mischen mittels Rühren entsteht eine sogenannte Makroemulsion, welche anschließend hohen Scherkräften ausgesetzt wird. Während dieses Homogenisierungs-Prozesses entstehen kleine Tröpfchen. Hierbei wird durch die hohe Energie des Ultraschalls eine Monodispersität der Tröpfchen erreicht [3]. Dabei verhindert die

Stabilisierung durch eingesetzte osmotische Reagenzien durch Erhöhung des osmotischen Druckes innerhalb der Tröpfchen die Ostwald-Reifung, bei der üblicherweise, vermittelt durch die Differenz des Laplace-Drucks, ein Materiefluss von den kleineren Tröpfchen zu den größeren Tröpfchen stattfindet. Der Einsatz des Tensides und der dadurch erfolgenden gegenseitigen Abstoßung der Tröpfchen verhindert die Koaleszenz (bei der Tröpfchen zusammenstoßen und zusammenfließen). Für die Reaktion des Monomers wird im Anschluss die Polymerisation mittels eines Initiators gestartet (siehe Abbildung 1).

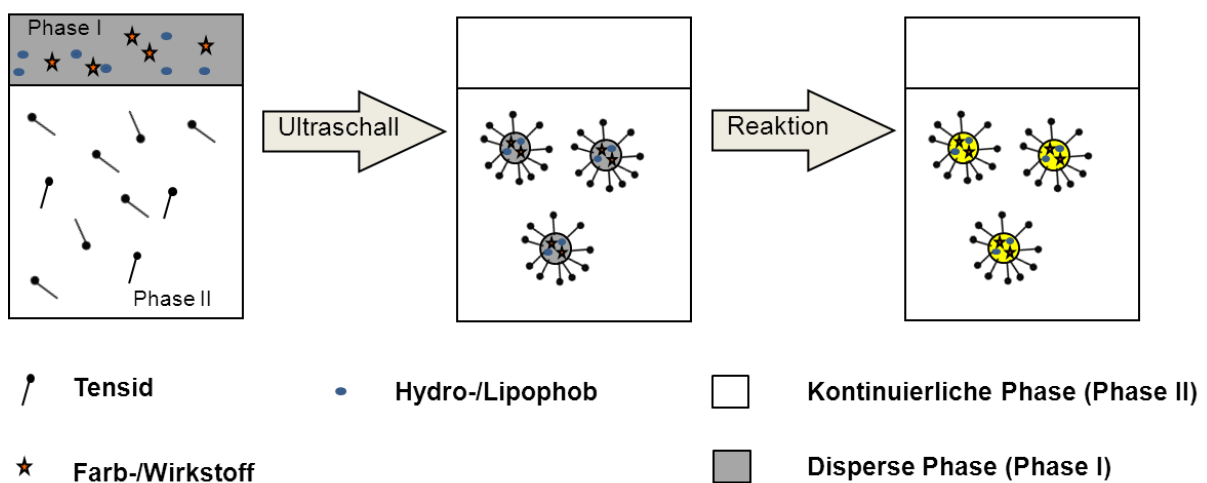


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Herstellung von Nanopartikeln mittels Miniemulsion. Nach dem Mischen von Phase I und II wird die entstandene Makroemulsion hohen Scherkräften (z.B. Ultraschall) ausgesetzt. Anschließend erfolgt die Polymerisierung (Reaktion).

Der Initiator kann dabei schon zuvor der dispersen Phase zugegeben worden sein oder erst nach der Homogenisierung der kontinuierlichen Phase, so dass der Initiator in die Tröpfchen diffundiert. Die vor der Polymerisierung mit Hilfe der eingesetzten Tensid-Menge, des Ultraschalls und der Beschallungsdauer [4, 5] eingestellten Tröpfchen-Größen werden beibehalten [6]. Die Größe der Nanosysteme beträgt dabei 50 bis 500 nm [7]. Bereits gebildete Polymere können ebenfalls über den Miniemulsionsprozess, kombiniert mit der

Lösemittelverdampfungstechnik zu Partikeln vernetzt werden. Hierzu wird das Polymer in einem Lösungsmittel gelöst und die Lösung zu einer Miniemulsion emulgiert. Die Besonderheit bei der Lösemittelverdampfungstechnik liegt in der Tatsache, dass nach dem Homogenisierungsprozess keine Reaktion initiiert wird, sondern das Lösemittel verdampft und während dieses Schrittes die Partikel gebildet werden. Werden die Nanosphären (Nanopartikel und-kapseln) in einem nicht-wässrigen Medium synthetisiert, müssen sie anschließend in wässrigen Tensid-Lösungen redispersiert werden, um sie für die Untersuchung biologischer Systeme einsetzen zu können.

2.1.2 Modifizierte Formen der Miniemulsion

Die Herstellung von polymeren Nanopartikeln über den Miniemulsionsprozess kann entweder in direkter oder in inverser Miniemulsion erfolgen [8]. Bei der direkten Miniemulsion liegt eine Öl-in-Wasser-Emulsion und bei der inversen Miniemulsion eine Wasser-in-Öl-Emulsion vor. Die Auswahl des Wasser zu Öl-Verhältnisses, des Tensids und der Temperatur beeinflusst dabei die Art der Miniemulsion. Als Öl werden verschiedene organische Lösungsmittel eingesetzt. Für eine direkte Miniemulsion wird zusätzlich ein Hydrophob, für eine inverse Miniemulsion hingegen ein Lipophob als osmotisches Reagenz zur Stabilisierung der Systeme benötigt (siehe Abbildung 2).

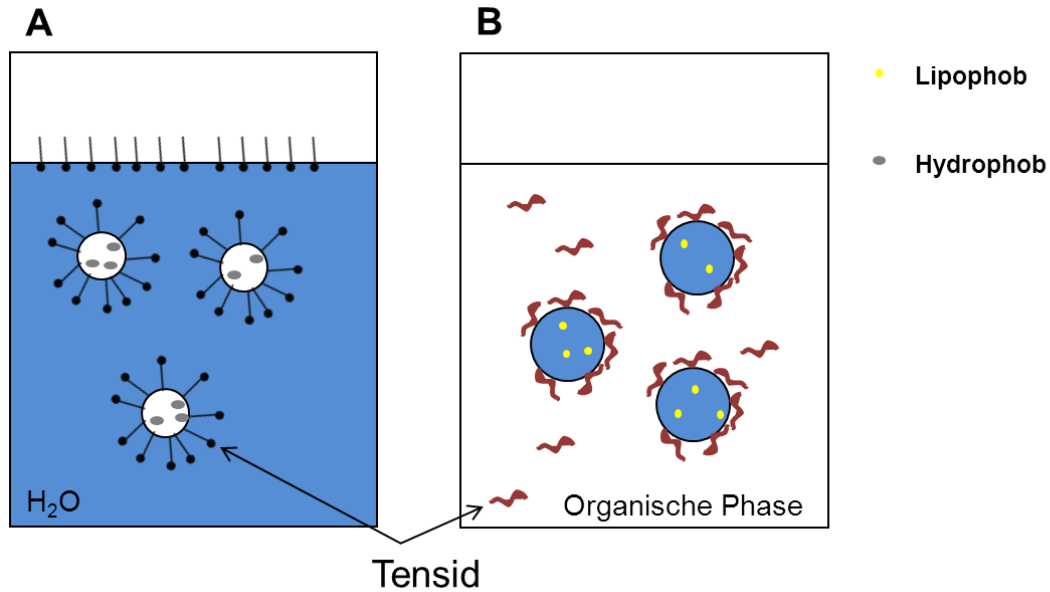


Abbildung 2: Skizze der beiden Miniemulsion-Typen. A: Direkte Miniemulsion mit Öltröpfchen in Wasser, ausgestattet mit einem Hydrophob und stabilisiert mit einem Tensid; B: Inverse Miniemulsion mit Wassertröpfchen in der organischen Phase, ausgestattet mit einem Lipophob und stabilisiert mit einem Tensid.

Die Synthese von Nanokapseln mit einem wässrigen Kern erfolgt immer mittels inverser Miniemulsion. Nanokapseln mit einem Hohlraum im Inneren bieten die Möglichkeit, Substanzen in gelöster Form zum Zielort zu transportieren.

2.1.3 Modifizierung der Nanosphären

Für unterschiedliche Einsatzgebiete bzw. Fragestellungen zur Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Nanosphären gilt es, die hergestellten Nanosphären schon entsprechend während des Herstellungsprozesses zu modifizieren. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Modifikationen der Nanosphären werden im Folgenden näher beleuchtet.

2.1.4 Funktionalisierung

Die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel und –kapseln kann auf mehreren Wegen erfolgen. Zum einen kann die Funktionalisierung kovalent über die Wahl der Monomere und der Comonomere erfolgen. Weiterhin kann dies adsorptiv über den Einsatz von Tensiden geschehen (siehe Abbildung 3).

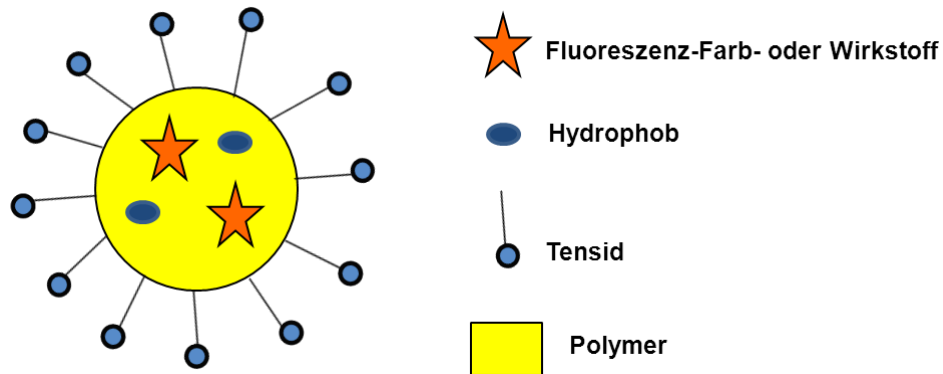


Abbildung 3: Skizze eines mit Hilfe von Polymeren und Tensiden funktionalisierten Partikels.

Für die vorliegende Arbeit wurden Nanopartikel mittels Miniemulsion und der Lösemittelverdampfungstechnik mit unterschiedlichen Monomeren hergestellt. In diesem Fall wurden Nanopartikel aus Polystyrol (PS), Poly-L-Lactid (PLLA) und Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt. Die Strukturformeln sind Abbildung 4 zu entnehmen.

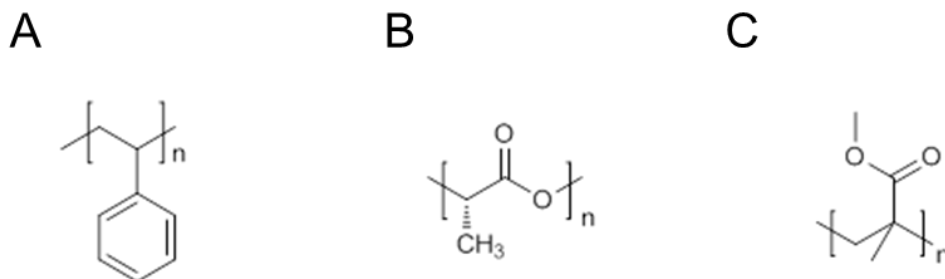


Abbildung 4: Strukturformeln der verwendeten Polymere. A: Polystyrol; B: PLLA; C: PMMA

Mit Polystyrol (PS) als Polymer für Nanopartikel wurden bereits mehrere Studien zu Nanopartikel-Zell-Interaktionen durchgeführt [9]. Der Grund liegt darin, dass es günstig zu beziehen und gut zu lagern ist. Weiterhin zeichnet es sich durch eine hohe Haltbarkeit aus und beeinflusst biologische Systeme nicht [10-12]. Aufgrund der Tatsache, dass PS-Partikel nicht biologisch abbaubar sind, eignen sie sich zudem idealerweise für Langzeitversuche. Die hohe Hydrophobizität von PS vereinfacht den Einschluss von hydrophoben Wirkstoffen. Mit Hilfe der Oberflächenfunktionalisierung lässt sich die stark hydrophobe Eigenschaft im Nachhinein verringern.

Poly-L-Lactid (PLLA), ein Polyester der Milchsäure, eignet sich für die Herstellung wirkstoffhaltiger Transportsysteme. Die Wirkstoffe können durch den Abbau der Polymerkapsel im Zielgewebe freigesetzt werden. PLLA ist ein nicht-zytotoxisches, bioabbaubares Polymer. Da Milchsäure im menschlichen Körper im Schweiß, Blut, Muskelserum, Speichel, in der Niere und in der Galle vorkommt, gilt PLLA als gut verträglich für den menschlichen Organismus. Weiterhin existieren im Zusammenhang mit PLLA Studien zu Interaktionen von Partikeln mit biologischen Systemen[13-19].

Polymethylmethacrylat (PMMA), ein hydrophobes Material, gilt ebenfalls als nicht-zytotoxisch und wird in geringerem Ausmaß als beispielsweise PS auch für Studien zu Nanopartikel-Zell-Interaktionen herangezogen [20-24]. Der Funktionalisierungseffekt der Comonomere in radikalischer Miniemulsionspolymerisation wird am Beispiel der Carboxyl-Funktionalisierung mittels Acrylsäure oder der Aminofunktionalisierung mit Hilfe des Aminoethylmethacrylat deutlich. Eine Oberflächenfunktionalisierung mit Phosphonat-Gruppen erfolgt in den meisten Fällen mit Hilfe des Comonomers Vinylphosphonsäure [25]. Eine Ausnahme stellt die Phosphonat-Funktionalisierung mit Hilfe von „Surfmeren“ dar, auf die in Kapitel 6.1.6 eingegangen wird [26].

Zur Herstellung der Protein-Nanokapseln wurden verschiedene Proteine verwendet und die Kapseln mit entsprechenden Tensiden redispergiert. Die

verwendeten Biomakromoleküle waren FCS (engl. Foetal calf serum), BSA (engl. Bovine serum albumine), ssDNA und Dithiol-ssDNA. Der technisch einfachste Weg, eine gezielte Oberflächenfunktionalisierung durchzuführen, ist der Einsatz stabilisierender Tenside, die nach der Polymerisierung auf der Partikel- oder Kapseloberfläche adsorbiert werden. Dabei können die Tenside in ionische und nicht-ionische Tenside unterteilt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Tensid, Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTMA-Cl) als kationisches Tensid und Lutensol AT50 (Lut) als nicht-ionisches Tensid verwendet. Die Strukturformeln der Tenside sind in Abbildung 5 dargestellt.

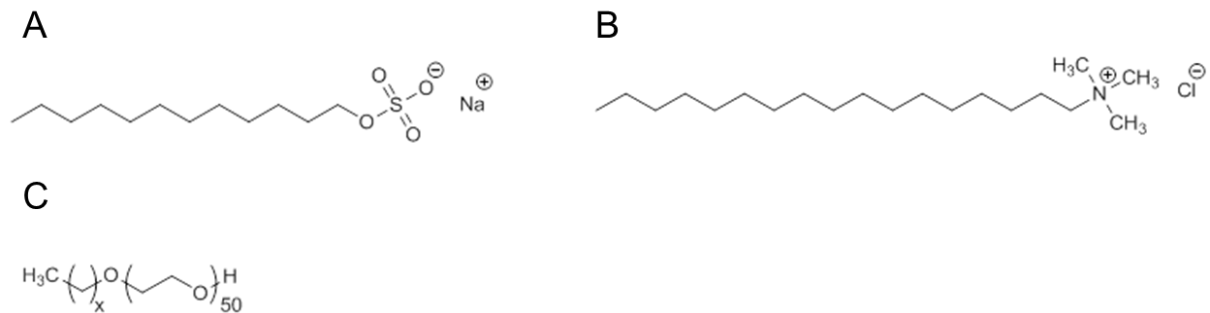


Abbildung 5: Strukturformeln der eingesetzten, stabilisierenden Tenside. A: SDS; B: CTMA-Cl; C: Lutensol AT50, $x = \text{C}_{15}$ oder C_{17}

Da die verschiedenen Partikeln und Kapseln in biologischen Systemen nur schwer zu detektieren sind, werden diese mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Bei den in dieser Studie verwendeten Partikeln wurden die hydrophoben Fluoreszenz-Farbstoffe N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid (PMI) und Bodipy-2 verwendet. Die Markierung der aus Biopolymeren hergestellten Nanokapseln aus vernetzten Biopolymeren erfolgte dagegen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (siehe Abbildung 6).

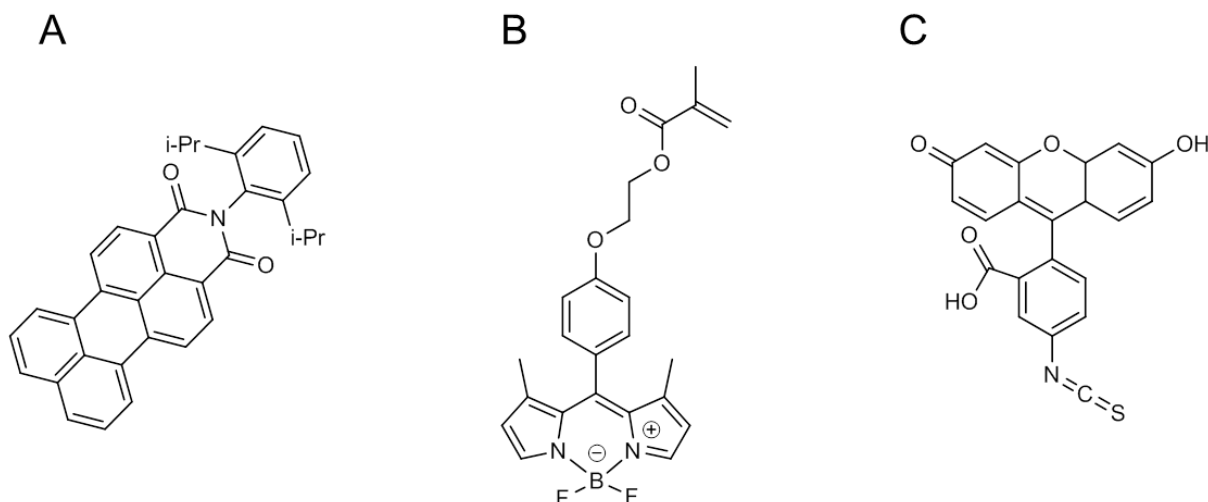


Abbildung 6: Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe. A: PMI; B: Bodipy-2; C: FITC

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zur Detektion von Partikeln oder Kapseln im Zell-System spielt in den Naturwissenschaften seit jeher eine große Rolle für die Untersuchungen der Nanosphäre-Zell-Interaktion [27]. Die Einbindung eines Fluoreszenz-Farbstoffes kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Zum einen kann der Farbstoff mittels Adsorption nicht-kovalent an den Partikel gebunden werden, mittels Copolymerisation (in radikalischer Polymerisation) einpolymerisiert [28] oder physikalisch eingekapselt werden. Die für diese Arbeit verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe lagen nicht-kovalent gebunden (PMI) und kovalent gebunden (Bodipy-2, FITC) vor.

2.1.5 Polyethylenglykol (PEG)

Polyethylenglykol (PEG), ein Polyether mit der allgemeinen Summenformel $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$, wird bei der Herstellung von vielen Medikamenten eingesetzt. Beispielsweise wurden Liposomen, die den Wirkstoff Paclitaxel enthalten, PEGyliert [29]. Bei anderen wirkstoffhaltigen Substanzen wurde PEG kovalent angebunden [30]. Die erste Beschreibung der PEGylierung erfolgte in den 70iger

Jahre durch *Davies und Abuchowsky* [31, 32] und eröffnete in der Pharmakologie und Medizin neue Möglichkeiten. Das diesen Arbeitsschritten zugrundeliegende Problem ist, dass dem menschlichen Organismus verabreichte Wirkstoffe vom Körper sogleich als Fremdkörper erkannt und über die Leber/Niere eliminiert wurden. Mit hydrophilem PEG umhüllte Nanopartikel und -kapseln adsorbieren weniger Proteine und bilden somit eine reduzierte Protein-Corona aus und werden von Zellen weniger erkannt. Dieser Effekt erhöht die Verweilzeit der Nanopartikel im Blutkreislauf und fördert den Transport von wirkstoffbeladenen Nanosystemen zu ihrem Zielgewebe. Durch eine verminderte unspezifische Aufnahme durch vitale Zellen kann ein passives *Targeting* in Tumorzellen erreicht werden [33, 34], d.h. PEGylierte Nanopartikel und -kapseln sind in hohem Maße resistent gegen die Phagozytose [35]. Die Effekte der PEGylierung hängen dabei auch vom Molekulargewicht und der Konzentration des PEG auf der Partikel- oder Kapseloberfläche ab [36]. Basierend auf dem Modell von *Szleifer* ist die reduzierte Proteinadsorption unter anderem auch auf die PEG-Kettendichte und -länge zurückzuführen. Die Reduktion der Proteinadsorption ist intensiver ausgeprägt je dichter die PEG-Ketten auf Oberflächen vorliegen [37]. PEG hat den Vorteil, nur eine geringe Zytotoxizität aufzuweisen, die Biokompatibilität zu erhöhen und FDA- („*Food and Drug Administration*“) geprüft zu sein. Nachdem mit der Miniemulsionstechnik PEGylierte Polystyrolpartikel synthetisiert wurden [38], wird im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Polystyrol-Partikeln mit unterschiedlich langen PEG-Ketten auf die Zellaufnahme untersucht.

2.1.6 Formgebung

Eine weitere Möglichkeit, Nanopartikel zu modifizieren und Einfluss auf die Nanopartikel-Zell-Interaktionen zu nehmen, bietet die Veränderung der Form. In der Regel haben die mittels der Miniemulsionstechnik synthetisierten Nanopartikel eine sphärische Form. Studien zu Interaktionen zwischen sphärischen Nanopartikeln und Zellen finden sich in hinreichender Zahl. Studien

zu formveränderten Nanopartikeln und deren Zusammenspiel mit verschiedenen Zelllinien sind dagegen in geringer Zahl vorzufinden und noch verhältnismäßig am Anfang [39]. Dennoch ist die Bedeutung dieser Faktoren in den letzten Jahren als einflussreich auf zellspezifischen Antworten erkannt worden [40-42]. Eine kantige Form der Nanopartikel fördert deren Aufnahme in Zellen, lässt aber gleichzeitig auch die Zytotoxizität ansteigen [43]. In der Natur verläuft die Formgebung oder das Wachstum in der Regel anisotrop. Dieser Umstand regte dazu an, den Einfluss der Form von Nanopartikeln auf deren Aufnahme in verschiedene Zelllinien und deren Zytotoxizität näher zu betrachten. Im Rahmen der Dissertation von (...) am Max-Planck-Institut für Polymerforschung wurden Nanopartikel mit einer gestreckten bzw. langgezogenen Form synthetisiert und sind in der Publikation von *Florez et al.* beschrieben worden [44]. Die Herstellung der verstreckten Nanopartikel wird zusätzlich in Kapitel 5.3 erläutert. Eine weitere Formveränderung von Polystyrol-Partikeln kann durch Kristallisierung erreicht werden. Hierzu wurden von (...) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung) im Rahmen seiner Dissertation mittels Lösemittelverdampfungstechnik aus Miniemulsionströpfchen kristalline Nanopartikel mit Hilfe von Styrol-Polymeren mit unterschiedlichen Taktizitäten (siehe Abbildung 37) hergestellt [45]. Die Aufnahme und die Zytotoxizität der kristallinen und verstreckten Nanopartikel in verschiedene Zelllinien wird in dieser Arbeit beschrieben.

2.2 Aufnahme von Nanokapseln und Nanopartikel

Auf die mehr dem Bereich der Chemie zuzuordnenden Darstellungen der Nanopartikel- und Nanokapsel-Produktion mittels Miniemulsion und deren Modifikationsmöglichkeiten folgen nun Erläuterungen zu biologischen Aspekten der Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen. Das Wissen um den allgemeinen Aufbau einer Zelle bzw. der Zellmembran, den damit verbundenen zellulären Transportmechanismen und weiteren biologischen Effekten erleichtert das Verständnis vom Weg des Nanopartikels innerhalb dieses Systems.

2.2.1 Die Zellmembran

Seit Charles Overton 1895 zum ersten Mal nach verschiedenen Beobachtungen mit leicht in Zellen gelangenden, fettlöslichen Substanzen die Vermutung äußerte, dass eine biologische Membran aus Lipiden besteht [46], gehört die Beschreibung einer Zellmembran zum Standardrepertoire naturwissenschaftlicher Fachliteratur [47-50]. Die Zellmembran von Eukaryonten dient als physikalischer Schutz und Abgrenzung der Zelle. Sie besteht aus einer 6 bis 12 nm dicken Phospholipid-Doppelschicht [51], bei der ein Phospholipid-Molekül aus einer hydrophoben Fettsäure-Seitenkette und einem hydrophilen Kopf aufgebaut ist. Diese Phospholipid-Doppelschicht enthält auch Cholesterin, die das von *Singer and Nicolson* beschriebene Flüssig-Mosaik-Membranmodell ermöglichte [52]. Weiterhin sind in diese Doppelschicht verschiedene Proteine, wie z.B. integrale Proteine oder Glykoproteine, eingebettet. Desweiteren gehen periphere Proteine spezifische Wechselwirkungen mit der Zellmembran ein (siehe Abbildung 7). Auf der extrazellulären Seite der Zellmembran finden sich die Polysaccharide der Glykokalix, gebunden an einen Teil der Phospholipide. Die Zellmembran hat zum einen die Funktion, als passive, für einzelne Komponente semipermeable Barriere zu fungieren, zum anderen ist die Zellmembran auch für den aktiven Transport von Substanzen in die Zelle und umgekehrt zuständig. Beim passiven Transport können H₂O, Anionen und Kationen in die Zelle und wieder hinaus gelangen. Glukose und andere nicht-ionische Komponenten können ebenfalls auf

diese Art und Weise das Zellinnere passieren. Beim aktiven Transport werden mit Hilfe von Membranpumpen Natrium-Ionen und verschiedene Proteine in die Zelle, Kalium-Ionen und andere Substanzen, wie z.B. Glukose, aus der Zelle heraus befördert. Diese Methode ermöglicht zusätzlich der Zelle, durch Koordination des Verhältnisses zwischen Kationen und Anionen ein elektrisches Feld aufzubauen. Diese Transportfunktion dient weiterhin der Kommunikation zwischen den Zellen, zur Beseitigung pathogener Substanzen und dem Schutz der Zellverbände.

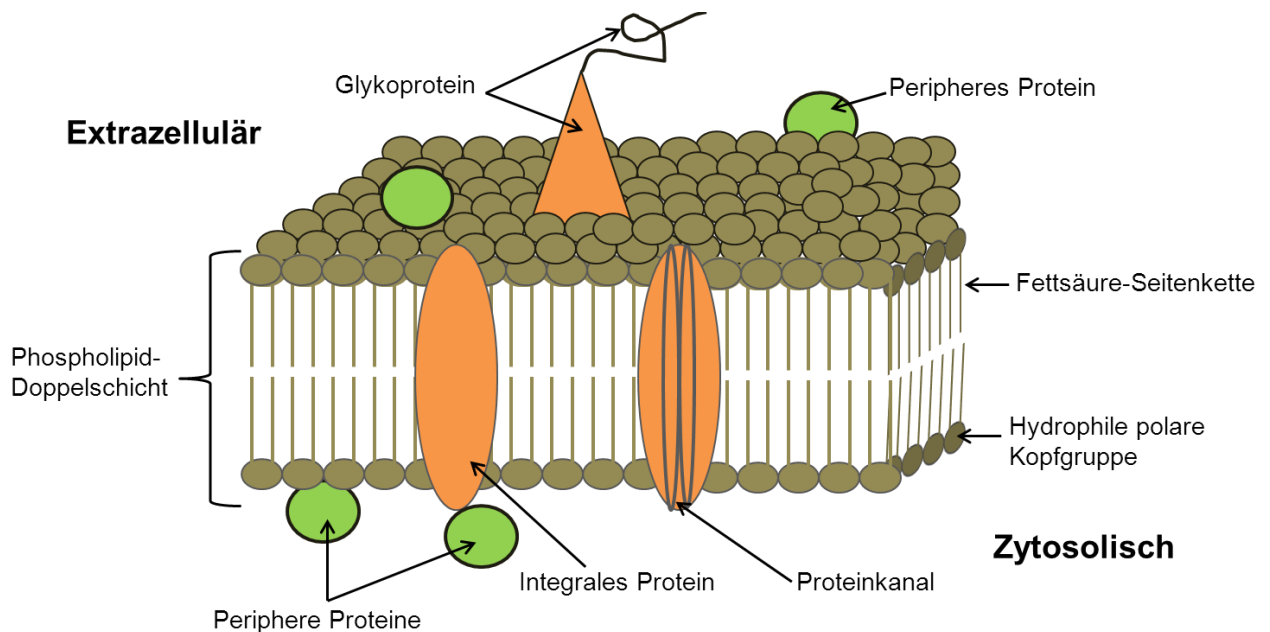


Abbildung 7: Skizze einer typischen zellulären, eukaryontischen Plasmamembran.

Die zuvor erwähnten integralen Proteine werden auch als Transmembran-Proteine bezeichnet, durchspannen die Membran häufig sogar mehrfach und stellen beispielsweise die Membranpumpen für den aktiven Transport von Substanzen dar. Die komplexe Ausprägung der Zelloberfläche dient neben der Stabilisierung der Zelle und dem Zusammenhalt der Zellverbände auch dem Erkennen von Substanzen. Mit der Glykokalix interagieren z.B. pathogene

Keime, wie Viren und Bakterien, mit Rezeptoren beispielsweise Hormone, Neurosekrete und -transmitter und weiteren Molekülen.

2.2.2 Zelluläre Transportmechanismen

Zur Verteidigung des Organismus gegen pathogene Substanzen oder zur Aufnahme essentieller Bausteine für das Wachstum werden die jeweiligen Komponenten wie Makromoleküle, Viren oder zelluläre Parasiten über membranumhüllte Vesikel ins Zellinnere aufgenommen. Feste Komponenten, die größer als 2 µm sind wie beispielsweise Bakterien oder Zellbruchstücke, werden mittels Phagozytose in sogenannten Phagosomen, größere Mengen extrazellulärer Flüssigkeit dagegen mittels Makropinozytose (siehe Abbildung 8.1) von den Zellen aufgenommen. Dabei bilden sich Pseudopodien, welche das zu endozytierende Objekt festhalten und einschließen [53, 54]. Die beiden Mechanismen Phagozytose und Makropinozytose lassen sich hauptsächlich biochemisch unterscheiden [53]. Kleinere feste oder flüssige Substanzen und in diesem Zusammenhang auch Nanopartikel oder -kapseln werden demgegenüber von vielen Zellen aber mittels Endozytose aufgenommen. Die gegebene Tatsache, dass die Größen der eingesetzten Partikel im Bereich zwischen 100 und 500 nm liegen, machen den Aufnahmeweg Endozytose für diese Arbeit interessant. Die Aufnahme erfolgt dabei durch als Endosomen bezeichnete membranumhüllten Vesikel. Die Bildung dieser Endozytosevesikel erfolgt dabei durch die Einstülpung der sich zum Zellinneren hin befindenden Zellmembran, die Ablösung des neugebildeten Vesikels von der Zellmembran und dessen Transport ins Zytoplasma in Form von frühen Endosomen, in deren Inneren das Milieu einen pH-Wert von 6,0 enthält. Die frühen Endosomen werden zum Teil an die Zellmembran zurücktransportiert, um ihren Inhalt in den extrazellulären Raum zu entleeren (Recycling). Ein anderer Teil der frühen Endosomen entwickelt sich zu späten Endosomen (pH 5,0) oder nach Verschmelzung mit Lysosomen zu sekundären, Verdauungsenzyme enthaltene Lysosomen. In den Lysosomen ist das für die Aktivierung der lysosomalen Enzyme Milieu mit pH 3,8 bis 4,8 saurer

als im Zytoplasma mit ungefähr pH 7,0 [55]. Hier erfolgt der enzymatische Verdau und die einzelnen, aufgenommenen Bestandteile, wie z.B. Cholesterin, werden an ihren Bestimmungsort gebracht [47-49]. Abhängig von den aufzunehmenden Komponenten und deren Größen [56] kann zwischen mehreren Endozytose-Mechanismen unterschieden werden (siehe Abbildung 8).

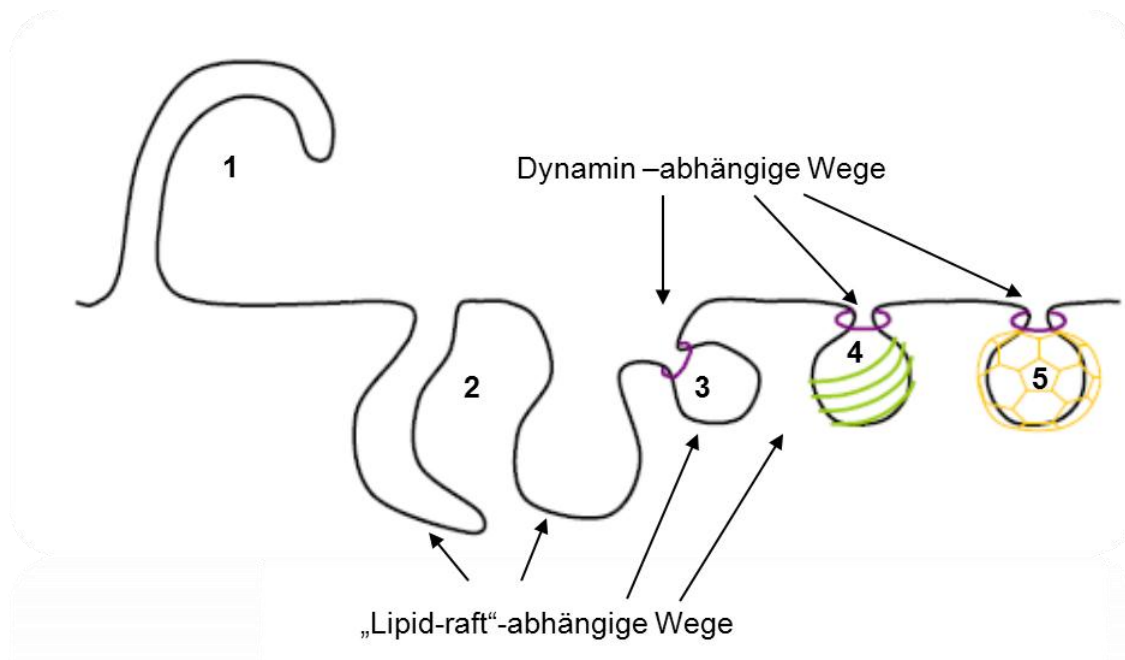


Abbildung 8: Darstellung verschiedener Endozytose-Wege. 1: Makropinozytose; 2: Dynamin-unabhängiger und „Lipid raft“-abhängiger Weg; 3: Dynamin- und „Lipid raft“-abhängiger Weg; 4: Dynamin-, „Lipid raft“- und Caveolin-abhängiger Weg; 5: Dynamin- und Clathrin-abhängiger Weg. Modifiziert nach *Kirkham et Parton* [57].

An einer Vielzahl von Endozytose-Mechanismen bzw. den involvierten Rezeptoren sind auch sogenannte „Lipid rafts“ beteiligt [58]. Unter „Lipid rafts“ versteht man dynamische Membrandomänen, die reich an verschiedenen Lipiden, Cholesterin und Sphingomyelin sind und die sich ggf. zu größeren „Lipid rafts“ zusammenlagern können [59]. Der Dynamin-, „Lipid raft“- und Caveolin-abhängige Weg der Endozytose ist vor allem in den Endothel-Zellen vorzufinden [60] und zeichnet sich durch die Ausbildung von ca. 60 nm großen Einstülpungen der Zellmembran aus, bei der die sich bildenden Vesikel vom Membranprotein

Caveolin umgeben werden (siehe Abbildung 8.4). Beim Caveolin-initiierten Endozytose-Weg werden Objekte bis zu einer Größe von 80 nm aufgenommen [56]. Beim Dynamin- und Clathrin-abhängigen Weg der Endozytose (siehe Abbildung 8.5) werden kugelförmige, auf der Innenseite Clathrin-Proteine enthaltende Einstülpungen der Zellmembran gebildet, die bei einer durchschnittlichen Größe von 120 nm durch Dynamin abgeschnürt werden [61, 62]. Laut *Canton and Battaglia* werden beim Clathrin-initiierten Endozytose-Weg bis zu 300 nm große Objekte aufgenommen [56]. Nach Abstoßung der Clathrin-Proteine wird das betreffende Vesikel zu einem frühen Endosom und durchläuft dieselben Prozesse wie andere frühe Endosomen. Die Clathrin-vermittelte Endozytose verläuft deutlich schneller als die Caveolin-vermittelte Endozytose. Die Abschnürung der Vesikel erfolgt mit Hilfe von Dynamin unter Verbrauch von Guanosintriphosphat (GTP). Mittels Inhibitoren können Aufnahmewege gezielt geblockt werden. Studien zeigen, dass in solch einem Fall andere Aufnahmewege aktiviert werden [63, 64]. Weiterhin existieren auch Dynamin-unabhängige und „Lipid raft“-abhängige Wege der Endozytose (siehe Abbildung 8.2) und ebenso Dynamin- und „Lipid raft“-abhängige Wege der Endozytose ohne Involvierung von Clathrin oder Caveolin (siehe Abbildung 8.3) [62]. Andere zelluläre Elemente wie Aktin oder das zuvor erwähnte Cholesterin sind dagegen an allen Endozytose-Prozessen beteiligt [65].

2.2.3 Einfluss der Nanopartikel- und Nanokapselbeschaffenheit auf die Zellaufnahme

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln schon beschrieben wurde, wird die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen von einer großen Bandbreite an unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Die Anzahl der möglichen Modifikationen von Nanopartikeln und –kapseln ist allerdings so groß, dass in diesem Fall nur auf eine Auswahl von Partikelmodifikationen und deren Auswirkungen eingegangen werden soll. An erster Stelle sollte das verwendete Material erwähnt werden. Wie schon in Kapitel 3.1.3.1 erwähnt, hat das eingesetzte Polymer und dessen Funktionalisierung eine große Auswirkung auf die

Wechselwirkungen zwischen Zelle und Nanopartikel oder -kapsel. Das eingesetzte Material beeinflusst die Interaktionen mit Serum-Proteinen und auf diesem Weg daher das Aufnahmeverhalten in die Zelle [66]. Durch das verwendete Material werden weitere Parameter beeinflusst, wie z.B. der Glaspunkt [67]. Vom Glaspunkt hängt die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel auch ab, da mit sinkendem Glaspunkt die Elastizität der Nanopartikel zunimmt [67]. Ein ebenfalls bekannter Faktor ist die Größe der Nanopartikel und -kapseln. Zum Beispiel werden Partikel, deren Größe sich im Bereich von 2 μm befinden, am schnellsten in Form von einer Phagozytose durch die Makrophagen in der Leber aus dem Blutkreislauf eliminiert [68-70]. Die meisten nicht-phagozytierende Zelllinien präferieren Partikel, deren Größe sich im Bereich von 100 nm bis 10 μm befindet [71, 72]. Beachtenswert ist ebenfalls die Tatsache, dass die durch den Durchmesser des Partikels definierte Krümmung die Affinität zu Proteinen und somit die Ausbildung einer Protein-Corona beeinflusst [73, 74]. Ein weiterer Faktor ist die Form der Nanopartikel. *Sharma et al.* untersuchten den Einfluss der Partikelform auf zelluläre Aufnahme durch Makrophagen [75]. Dabei setzten sie unterschiedlich modifizierte ellipsoide Partikel ein. Ein Teil der Partikel wurde langgestreckt und ein anderer Teil rund und flach hergestellt. Fazit der Studie war, dass die Form der Partikel einen beträchtlichen Einfluss auf die Phagozytose hat und die bisher höchste Aufnahmerate bei den runden und zugleich flachen Partikeln zu verzeichnen war [75]. Diese Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse einer Studie von *Doshi et al.*, in der die Erkennung der Form und Größe von Makrophagen gezeigt wurde [76]. Eine andere Studie, in der längliche Nanopartikel mit großen Aspekt-Verhältnissen eingesetzt wurden, zeigte, dass in diesem Fall kaum bis keine Phagozytose stattfand [77, 78]. Diese Erkenntnisse könnten sich als hilfreich im Kampf gegen beispielsweise den HI-Virus [79] oder Atherosklerose [80] erweisen, bei denen die Makrophagen die Zielzellen einer Beeinflussung darstellen. Des Weiteren wird aus dem Bereich der Formvielfalt auch die kristalline Form von Nanopartikeln und deren Auswirkungen auf die Nanopartikel-Zell-Interaktionen untersucht. Der Literatur sind diesbezüglich nur wenige Informationen zu entnehmen, die besagen, dass eine kantige Oberfläche von Nanopartikeln deren Aufnahme in Osteoblasten [1] und andere Zelllinien [43]

begünstigt. Auch die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel und -kapseln hat einen beträchtlichen Einfluss auf die Nanopartikel-Zell-Interaktionen [68, 81-85]. Schließlich ist die Oberfläche der eingesetzten Nanopartikel und -kapseln neben der Größe der von den Zellen zuerst „wahrgenommene“ Faktor. Mit Hilfe der Oberflächenfunktionalisierung lässt sich die Hydrophobizität der Partikeloberfläche und somit die Stärke der Ausbildung einer Protein-Corona beeinflussen. Frühere Studien zeigten zusätzlich, dass die unterschiedlichen Funktionalisierungen die Aufnahme der Trägersysteme in Zellen verstärken oder abschwächen. Aminogruppen- oder Carboxylgruppen-funktionalisierte Nanopartikel zeigen z. B. eine sehr gute Aufnahme in hMSCs und HeLa-Zellen [86, 87]. Eine andere Möglichkeit der Einflussnahme auf die Nanopartikel-Zell-Interaktionen bietet der Einsatz von Tensiden. Die in Kapitel 3.1.3.1 erwähnten Tenside SDS, CTMA-Cl und Lutensol AT50 ermöglichen eine Steuerung der Oberflächenladung der Nanopartikel und -kapseln und auf diesem Weg die Aufnahme ins Zellinnere [86]. Mit Hilfe des negativ geladenen SDS und des positiv geladenen CTMA-Cl lässt sich die zelluläre Aufnahme von Trägersystemen fördern. Das nichtionische, PEGylierte Tensid Lutensol AT50 zeigt in dieser Hinsicht eine Verminderung der Zellaufnahme. Andererseits können sich die Tenside während der Interaktionen mit den Zellen als zytotoxisch erweisen und beispielsweise die Zellmembran zerstören [88].

2.2.4 Protein-Corona

Nanopartikel oder -kapseln, die beispielsweise per vaskulärer Applikation in den Organismus gelangen, gehen unverzüglich Interaktionen mit unzähligen verschiedenen Proteinen ein. Die Ausbildung einer Protein-Schicht auf der Partikel-Oberfläche wird als Protein-Corona (*Corona* lat., Kranz) bezeichnet. Ihre Wirkung auf die Zielzellen wird unter anderem von Wechselwirkungen mit den Proteinen beeinflusst, da durch die Ausbildung einer Protein-Corona das Gesamtbild des Partikels und dementsprechend auch die biochemische Eigenschaften verändert bzw. beeinflusst werden. Umgekehrt beeinflussen die

Oberflächen-Eigenschaften der Partikel die Interaktionen mit den Proteinen im umgebenden Medium. Dabei ist die Art und Weise der Interaktionen zwischen den Partikeln und Proteinen für die Etablierung zielgerichtet Medikamenten-transportierender Nanomaterialien von großer Bedeutung für die Medizin und Pharmakologie [89, 90]. Durch die direkte Steuerung der Protein-Corona-Bildung lässt sich ggf. die Toxizität verringern und die Aufnahme-Effizienz in Zelllinien steigern. Die Steigerung der zielgerichteten Anreicherung von Nanomaterialien in pathogenem Gewebe dank des EPR-Phänomens, der in Kapitel 3.2.5 näher erläutert wird, erfolgt zum aktuellen Zeitpunkt bevorzugt durch die PEGylierung (siehe Kapitel 5.4.1). Mit PEG modifizierte Nanopartikel oder -kapseln gehen weniger bis keine Wechselwirkungen mit den sie umgebenden Proteinen ein. Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dieser Problematik und entsprechend viel Literatur ist vorzufinden [89, 91-95]. Studien mit Polystyrol-Partikel mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen zeigten, dass die verschiedenen Funktionalisierungen zu verschiedenen Protein-Anlagerungen auf der Partikeloberfläche führten [96]. Im Rahmen dieser Studie wurde die höchste Bindungs-Affinität gegenüber BSA (*Bovine serum albumine*, aus Kühen stammendes Serum-Albumin) für mit Phosphonsäure funktionalisierte Nanopartikel nachgewiesen. Hydrophobe Partikel neigen beispielsweise stark zu Wechselwirkungen mit HSA (Humanes Serum-Albumin) [97]. Weiterhin wird eine Ausbildung einer Protein-Corona um den Partikel herum auch von der Inkubationszeit, Bindungs-Affinität der Partikel, dem pH-Wert des Mediums und weiteren Faktoren beeinflusst [89, 98]. Eine Skizze der Ausbildung einer Protein-Corona um einen Nanopartikel herum findet sich in Abbildung 9. Die Proteinhülle um die Partikel herum kann durch das Eingehen von Wechselwirkungen mit anderen, ebenfalls Partikel umhüllenden Proteinen zu einer Aggregation der Partikel führen. Aggregierte Partikel werden in geringerem Ausmaß bis gar nicht von verschiedenen Zelllinien aufgenommen [99].

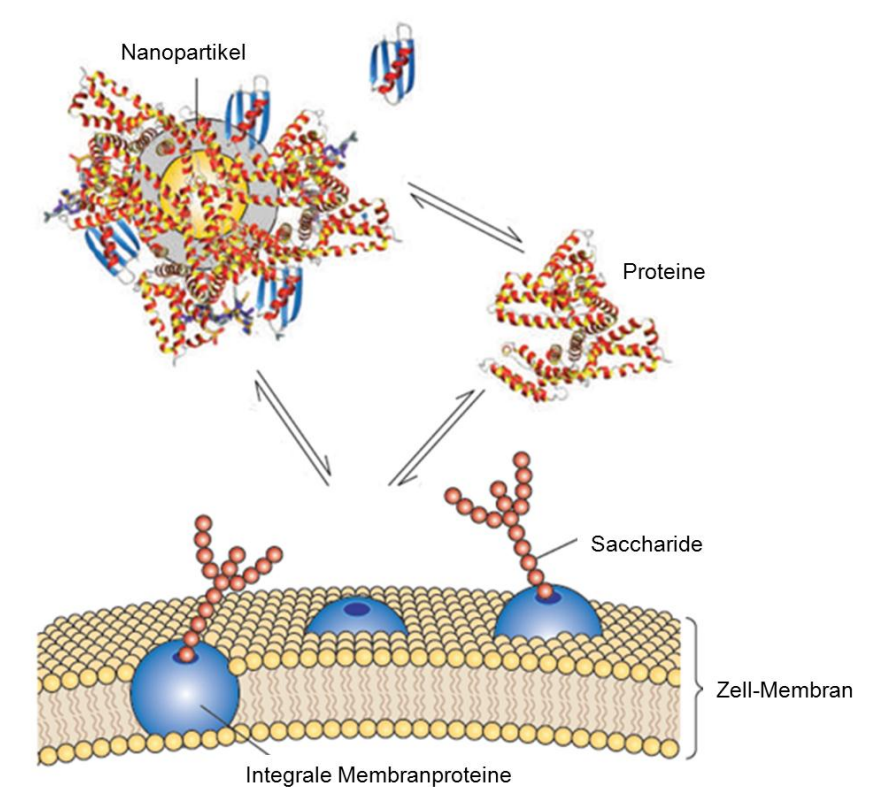


Abbildung 9: Darstellung der Ausbildung einer Protein-Corona [100].

2.2.5 EPR-Effekt

Das Phänomen der Anreicherung von Makromolekülen, Nanopartikeln und – kapseln im Tumorgewebe, bezeichnet als EPR-Effekt (engl. *enhanced permeability and retention*), wurde im Jahre 1986 erstmalig von *Matsumura and Maeda* nach mehreren Versuchsreihen mit markierten Proteinen beschrieben [101]. Dabei stellten sie fest, dass die markierte Proteine im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe überdurchschnittlich häufig anzutreffen waren. Der hiermit entdeckte EPR-Effekt lässt sich mit einer „erhöhten Permeabilität und Retention“ im Tumorgewebe übersetzen und wird in zahlreichen Publikationen erwähnt [102-106]. Dieses Phänomen ermöglicht das passive *Drug Targeting*, bei der ein gezielter Medikamententransport zum pathogenen Gewebe erfolgt. Malignes Tumorgewebe bildet im Gegensatz zu gesundem Gewebe sehr viel mehr Blutgefäße mit größeren Porenöffnungen aus. Zusätzlich ist das Lymphdrainage-System schwächer ausgebildet und das Tumorgewebe

durchlässiger. Dies führt dazu, dass Makromoleküle und Nanomaterialien leichter ins Tumorgewebe diffundieren können (*permeation*) und aufgrund des geschwächten Lymphdrainage-Systems in geringerem Ausmaß aus diesem ausgeschleust werden (*retention*). Auf diese Art und Weise erfolgt eine passive Anreicherung der Substanzen im Tumorgewebe (siehe Abbildung 10). Die Entdeckung des EPR-Effekts bedeutete in der Erforschung des *Drug Targetings* einen großen Fortschritt. Nun war man in der Lage, Nanomaterialien auf das Ziel, den EPR-Effekt zu steigern, hin zu modifizieren. Ein Beispiel für dieses Vorgehen stellt die in Kapitel 5.4.1 beschriebene PEGylierung von Nanopartikeln oder – kapseln dar. Durch die PEGylierung wird die Zirkulation der Nanopartikeln oder – kapseln in den Blutgefäßen signifikant erhöht.

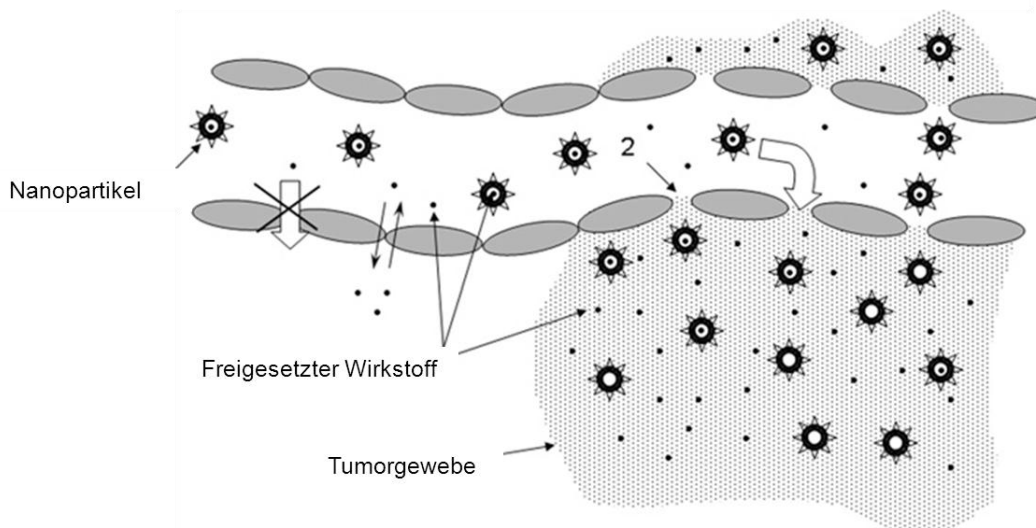


Abbildung 10: Darstellung des EPR-Effekts nach vaskulärer Applikation von Nanopartikeln [107].

2.2.6 Mechanismen von Nanopartikel-Toxizität

Während der Studien zur Zellaufnahme unterschiedlicher Nanopartikel und – kapseln und dem gleichzeitigen Streben nach besseren, leichter zu produzierenden Materialien für den Einsatz neuer Trägersysteme im pharmakologischen und medizinischen Bereich ist die Erforschung der

zytotoxikologischen Auswirkungen dieser Materialien von großer Wichtigkeit. Mehrere Nanomaterialien werden bereits in der klinischen Praxis eingesetzt, obwohl deren pathogene Auswirkungen noch nicht hinreichend bekannt sind. Die Art und Weise, wie ein aufgenommener Nanopartikel oder eine aufgenommene Nanokapsel zelluläre Funktionen bis hin zur Nekrose oder induzierten Apoptose beeinflussen kann, ist vielfältig. Ein negativer Einfluss von aufgenommenen Nanopartikeln ist beispielsweise die Versetzung der Zelle in einen Zustand des oxidativen Stresses. Jedoch ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht endgültig bekannt, wie der sich intrazellulär befindende Partikel das ROS- (*reactive oxygen species*) Niveau erhöht. Nach der Induktion des oxidativen Stresses beginnt die Zelle gegenzusteuern und verstärkt die Expression von antioxidativen Enzymen. Ist der ROS-Level jedoch zu hoch, wirken die antioxidative Enzyme innerhalb der Zelle kontraproduktiv. Dadurch können der Zellkern inklusive der DNA beschädigt [108], die sich in der Zelle befindenden Proteine denaturiert, Lipide peroxidiert und auf diesem Weg indirekt die Zellmembran beeinträchtigt und durch die Freisetzung von Zytokinen Entzündungsreaktionen ausgelöst werden [109]. Für Silber-Nanopartikel konnte eine Förderung der Genotoxizität [108], für verschiedenförmige Silika-Nanopartikel eine negative Beeinflussung der Zytoskelett-Organisation [110] nachgewiesen werden. Die Auslösung des programmierten Zelltods, bekannt unter der Bezeichnung Apoptose, unterliegt einer Reaktionskaskade und kommt natürlicherweise bei der Embryogenese, Metamorphose und anderen zellulären Entwicklungsprozessen vor [47, 49]. Die Apoptose wird ebenfalls bei irreparablen Schäden der Zelle ausgelöst, so dass die sich bildenden Vesikeln, die apoptotischen Körperchen, von Phagozyten ohne Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts der zerstörten Zelle aufgenommen und weiterverarbeitet werden können. Auch auf zytotoxischer Ebene kann die Apoptose durch Toxine induziert werden. Dabei läuft der Apoptose-Prozess auf molekularer Ebene grundsätzlich nach demselben Mechanismus ab. Verantwortlich für die Auslösung der Apoptose-Kaskade sind Proteine bzw. Signalstoffe, die unter der Sammelbezeichnung trophische Faktoren oder Trophine zusammengefasst werden. Trophische Faktoren, zu denen beispielsweise der bekannte Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth*

factor) zählt, steuern den Wachstums- und Ernährungszustand der Zellen. In Abwesenheit von trophischen Faktoren oder durch Blockierung der für sie zuständigen Rezeptoren durch Toxine werden die üblicherweise Apoptose hemmende Proteine an die Membran der Mitochondrien gebunden und bilden durch Zusammenlagerung neue Ionenkanäle in der Mitochondrienmembran. Durch diesen Prozess wird das sich normalerweise im Intermembranraum der Mitochondrien befindende Cytochrom-c freigesetzt. Das Cytochrom-c bindet an zelluläre, die Vorstufe des Proteins Caspase-9 bildende Proteine, induziert die Entstehung des apoptosefördernden Effektorproteins Caspase-9 und löst so die Apoptose verursachende Caspase-Kaskade aus. Die betroffene Zelle beginnt, sich zusammenzuballen, und das Zytosol schrumpft. Anschließend wird der Zellkern fragmentiert und die Zelle zersetzt sich und bildet apoptotische Körperchen aus [49]. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass der Zell-Inhalt nicht in den extrazellulären Raum freigesetzt wird, da die Nachbarzellen ansonsten Schaden nehmen könnten. Demgegenüber steht die Nekrose, bei der die betroffenen Zellen anschwellen, platzen und den intrazellulären, Entzündungsreaktionen hervorrufenden Inhalt freisetzen [47, 49]. Eine Nekrose wird in der Regel durch mechanische Verletzungen der Zelloberfläche ausgelöst.

3 Methoden

Die Herstellung neuer, zielgerichteter Transportmittel für Medikamente zur Bekämpfung von Erkrankungen mit einer Reduktion der unerwünschten Nebenwirkungen in Form von Nanopartikeln und -kapseln und die Analyse der Wechselwirkungen zwischen diesen und verschiedenen Zelllinien erfordert den Einsatz verschiedener Techniken und Assays. Im Folgenden werden diese näher erläutert.

3.1 Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser

In den letzten Jahren wurde für die Photometrie- und Fluoreszenzmessungen in Chemie, Biologie und Medizin immer häufiger der Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser eingesetzt. Für die Routineanalytik hat sich der Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser schon als ein vielseitig einsetzbares und dementsprechend äußerst wichtiges Utensil bewährt. Das geringe Einsatzvolumen führt zu einem geringen Reagenzien-Verbrauch, die zahlreichen Wells einer Mikrotiter-Platte zu schnellen, übersichtlichen Messungen und zur Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen zur gleichen Zeit, die Möglichkeit der Parallelmessungen zu einer Erhöhung der statistischen Genauigkeit. Das Detektionsgerät für diese Mikrotiter-Platten, Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser genannt, bietet ebenfalls zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten. Zum einen lassen sich sowohl die Fluoreszenz-Intensitäten, als auch die Absorption oder die Lumineszenz messen. Bei der Messung der Fluoreszenz-Intensitäten sind die Wellenlängen der Anregungen in der Regel variabel auswählbar, die Kanäle der Emissions-Messungen gezielt oder für eine Scan-Messung flexibel mit einer das Fluoreszenz-Spektrum zum größten Teil abdeckenden Spannbreite einstellbar. Der für die nachfolgend beschriebene Studien eingesetzte Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Leser Infinite M1000 von Tecan ist ein multifunktionelles Detektionsgerät mit all den zuvor beschriebenen Eigenschaften. Sein großer Vorteil liegt zudem darin, dass die Wellenlängen-Auswahl für die Fluoreszenz-

und Absorptionsmessungen dank des integrierten Monochromator-Systems (siehe Abbildung 12) flexibel ist.

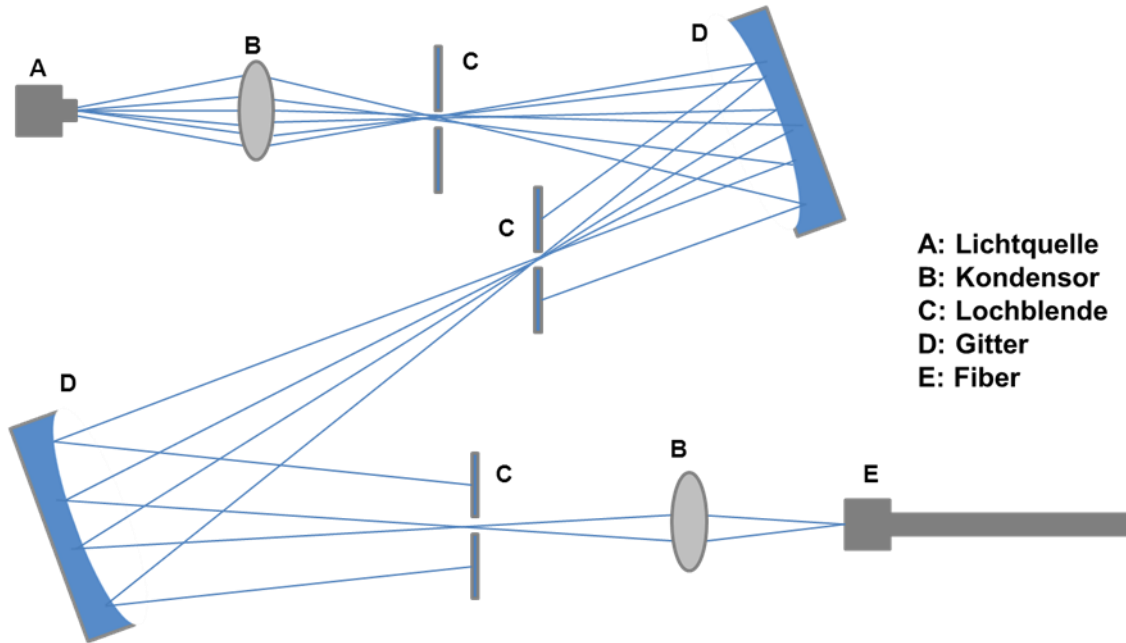


Abbildung 11: Aufbau des Monochromator-Systems des Mikrotiter-Platten-Lesers.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser verfügt über zwei integrierte Monochromatorsysteme. Ein Monochromatorsystem findet seinen Einsatz bei der Anregung und das andere Monochromatorsystem bei der Spezifizierung der gemessenen Emissionen. Mit Hilfe der Monochromatore lassen sich definierte Wellenlängen für die Anregung einstellen und ebenfalls definierte Wellenlängen messen. Weiterhin können die Messungen innerhalb des Geräts von unten oder von oben erfolgen (siehe Abbildung 12).

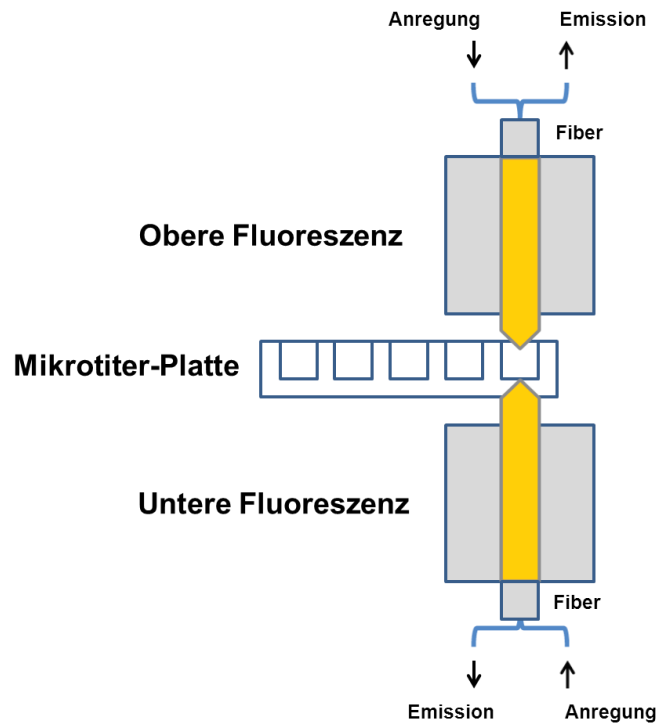


Abbildung 12: Messung der oberen und unteren Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten-Lesers. Modifiziert nach [111].

Bei einer Messung von oben kann die Z-Position innerhalb des zu messenden Wells variabel eingestellt werden. Dies bietet den Vorteil, sowohl auf dem Boden liegende adhärenente Zellen als auch frei schwebende Suspensions-Zellen messen zu können. Die Messungen erfolgen mit einer hohen Geschwindigkeit, so dass eine komplette 96 Well-Platte innerhalb von 2 min analysiert werden kann. Trotz der Geschwindigkeit ist die Sensitivität der Messungen hoch. Nach einer Anregung mit einer definierten Wellenlänge wird die Emission mittels Kondensoren gebündelt in ein Fasersystem weitergeleitet (siehe Abbildung 12). Kondensoren sind Feldlinsen, mit denen das eingehende Licht optimal aufbereitet und angepasst werden kann. Die zuvor erwähnten Fiber führen zum Detektor, wo die empfangenen Wellenlängen in Daten umgewandelt werden. Dabei kann der Eintrittsspalt bzw. die Lochblende (siehe Abbildung 11) für die zu messenden Wellenlängen und entsprechende Bandbreiten so justiert werden,

dass unspezifische Fluoreszenz ausgeschlossen werden kann. Die Auftrennung des einfallenden Lichts erfolgt hierbei mittels eines Gitters.

3.2 Durchflusszytometrie

Eine weitere Möglichkeit für quantitative Messungen der Partikelaufnahme in Zellen bietet die Darstellung der Zellen nach Fluoreszenz-Intensitäten mittels FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), einer Version der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können große Probenmengen in verhältnismäßig kurzer Zeit auf unterschiedliche physikalische Parameter hin analysiert werden. Aus diesem Grund findet diese Universaltechnologie ein sehr großes Einsatzgebiet in der klinischen Routinediagnostik als auch in den Naturwissenschaften. In der Medizin ermöglicht die Durchflusszytometrie eine Aufteilung der verschiedenen Blutzellen (z.B. Rote Blutkörperchen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) zur Diagnose von beispielsweise Leukämien oder Lymphomen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse der Fluoreszenz-Intensitäten der in verschiedene Zelllinien aufgenommenen Nanopartikel und -kapseln eingesetzt. Die Zellen werden dabei aus der Zellprobe in einem Hüllstrom eingesaugt und passieren eine Messzelle, in dem sie mit Lasern unterschiedlicher Wellenlängen angeregt werden. Die Zellen durchqueren dabei dank der hydrodynamischen Fokussierung innerhalb eines laminaren Stroms die Messzelle einzeln. Während der Anregung durch die Laserstrahlen wird das von den Zellen ausgehende Streulicht durch ein optisches System in einzelne Detektoren und von dort aus per digitale Signalverarbeitung zum Rechner geleitet. Die Vorwärtsstreuung (*Forward scatter*, FSC), bei der das Licht nur um 20° gestreut wird, zeigt dabei die Größe, die Seitwärtsstreuung (*Sideward scatter*, SSC), bei der der Grad der Streuung 90° beträgt, hingegen die Granularität der Zellen an. Mit Hilfe der anderen Detektoren wird die Fluoreszenz-Intensität der einzelnen Zellen in verschiedenen Emissionsfilter gemessen (siehe Abbildung 13). Dabei erfolgt die Zuweisung der Fluoreszenz für

jeden Kanal durch die Fluoreszenzauftrennung mit Hilfe dichroider Spiegel und Wellenlängen-Filter. Auf diese Art und Weise lassen sich mehrere Eigenschaften der Zellen (Größe, Granularität, Fluoreszenz) gleichzeitig analysieren.

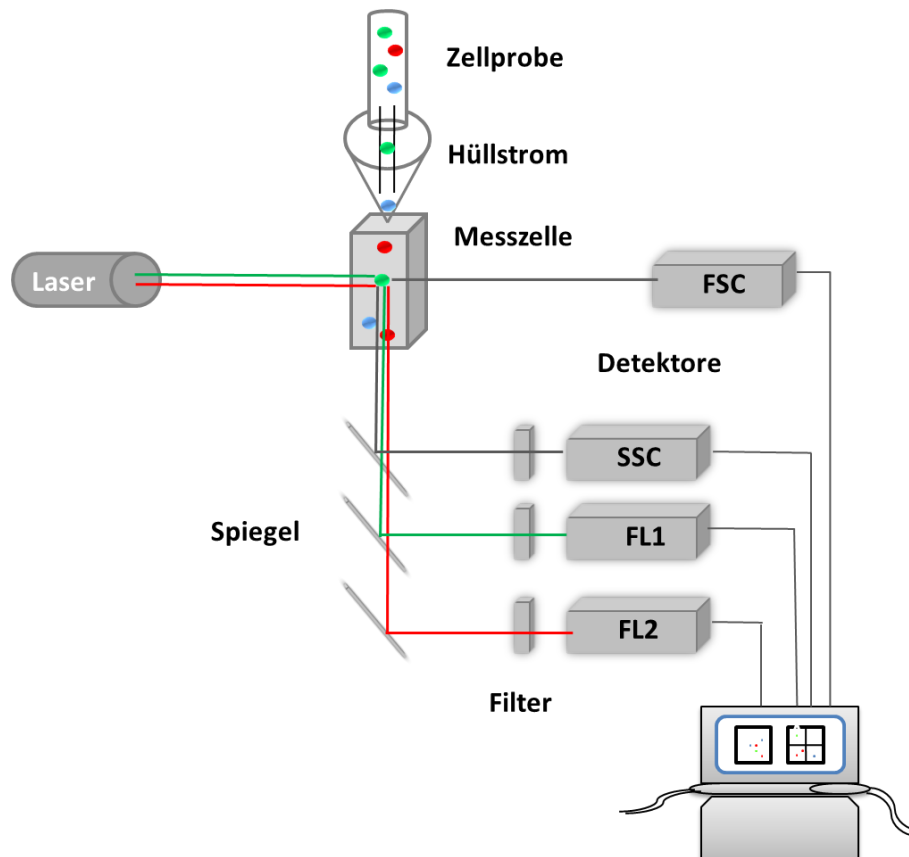


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Messprinzips der Durchflusszytometrie. Modifiziert nach [112].

3.3 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop

Nachdem im Vorfeld quantitative Analyse-Möglichkeiten fluoreszierender Partikel vorgestellt wurden, ist die Verifizierung derartiger Ergebnisse mittels bildgebender Verfahren von großer Wichtigkeit insbesondere bei zellbiologischen Analysen. Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (*Confocal laser scanning microscopy*, cLSM) bietet die Möglichkeit, qualitative Analysen bezüglich der Lokalisation und Dynamik von Nanosystemen in Zellen durchzuführen. So kann

geklärt werden, ob sich die aufgenommenen Nanopartikel oder -kapsel im Zellinneren oder vielmehr extrazellulär befinden, sowie in welche Zellkompartimente die Nanopartikel beziehungsweise -kapsel bevorzugt aufgenommen werden. Mit Hilfe des cLSM lassen sich solche Fragestellungen beantworten. Dabei liegt der Vorteil des cLSM gegenüber konventioneller Mikroskopie bei dem Bilderstellungsverfahren. Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie lässt immer nur eine oberflächliche Betrachtung der Gesamtfluoreszenz eines Objektes zu. Dies erschwert die qualitative Differenzierung bezüglich der Lokalisation des fluoreszierenden Objekts. Demgegenüber ist mittels cLSM und der damit gegebenen Möglichkeit, die konfokale Blende zur Bildung optischer Schnitte einzusetzen, eine präzisere Lokalisation des fluoreszierenden Objekts innerhalb des Präparats erreichbar. Der Einsatz von Lasern mit definierten Wellenlängen ermöglicht zudem die genaue Anregung des zu untersuchenden Objekts. Die Anregung der Probe erfolgt dabei durch einen fokussierten Laserstrahl in xy-Richtung. Das emittierende Fluoreszenz-Licht wird mittels einer konfokalen Blende fokussiert und durch Emissions-Filter zum Detektor weitergeleitet und ermöglicht auf diese Art und Weise die genaue Detektion des Objekts und deren Lage (siehe Abbildung 14). Auf Grund der Tatsache, dass mit Hilfe der Lochblende das Licht außerhalb der Fokusebene nicht durchgelassen wird, ist eine genaue Detektion der gewählten Fokusebene möglich (siehe Abbildung 15). Die hierfür eingesetzten Detektoren sind zumeist Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*, PMTs) und wandeln die Lichtsignale in digitale Signale um. Wird dieses Verfahren für mehrere Ebenen innerhalb des Präparats durchgeführt, ist nach einer digitalen Verrechnung der aufgenommenen Daten die Erstellung einer dreidimensionalen Ansicht möglich [50].

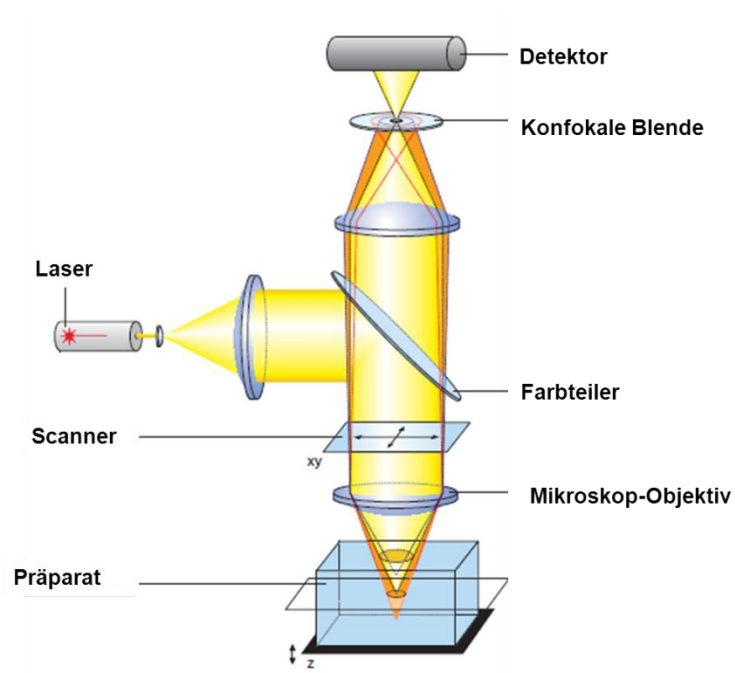


Abbildung 14: Aufbau des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Modifiziert nach [113].

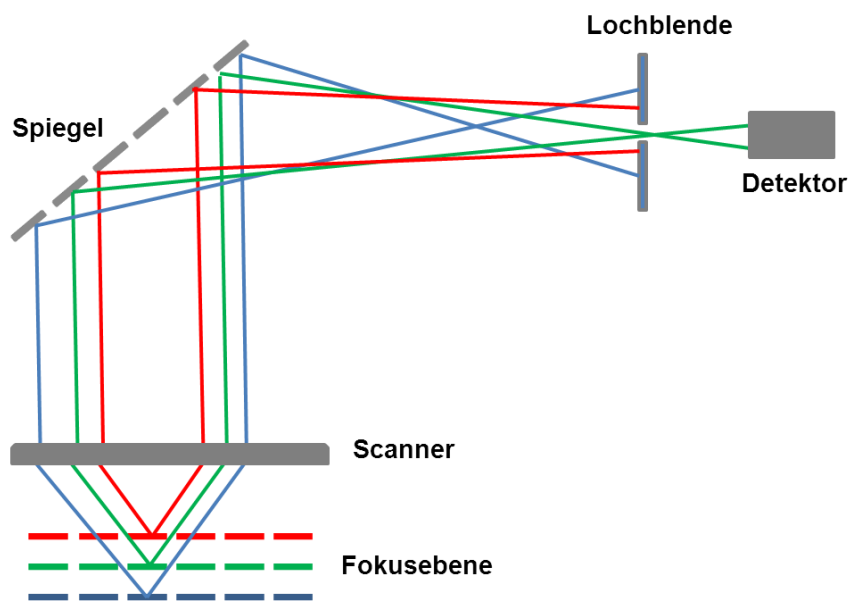


Abbildung 15: Schema der Funktionsweise eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Fokussiert wird die grün dargestellte Fokusebene.

4 Material und Durchführung

In diesem Kapitel werden die für die verschiedenen Zellstudien eingesetzten Materialien tabellarisch aufgelistet und die Durchführung der unterschiedlichen Analysearten beschrieben.

4.1 Material

4.1.1 Geräte

-80 °C Gefrierschrank Hera Freeze Top	Thermo Scientific
Absaugpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience
CLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica
CyFlow ML, Messprogramm FloMax 2.6	Partec
FCS Express V3	Partec
Brutschrank Inkubator C200	Labotect
Pipetten	Eppendorf
Plate Reader Infinite M1000	Tecan
Software i-control 1.6.19.0	Tecan
Stickstoff Zelltank LS6000	Taylor-Wharton
Vortexer Reax Control	Heidolph
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge 5430	Eppendorf
Zellzählgerät TC10	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank Flow Safe C-[Max Pro]3-130	Berner International
Pipettierhilfe Accujet Pro	Brand

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

3-Boden Zellkulturflaschen Nunclon Surface	Nunc
Costar® 96-well Plate	Corning Incorporated
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 & 50mL Falcon Flasks	Becton Dickinson
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one
Sterile Pipettenspitzen	Biozym
Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf
Well-Platten für Zellkultur	Greiner Bio-one

Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one
FACS Röhrchen 3,5 ml PS	Sarstedt
IBIDI Treat 60 µm dish	IBIDI

4.1.3 Reagenzien

7-Aminoactinomycin-D	Sigma
	oder Alexis Biochemicals
α-MEM	Lonza
CellMask™ Orange	Invitrogen
Ciprofloxacin	Fluka
DMEM	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	Invitrogen
DraQ5 Zellkernfarbstoff	Biostatus Limited
FCS	Invitrogen
Natrium-Pyruvat	Sigma Aldrich
Streptomycin/Penicillin	Invitrogen
Glutamax	Invitrogen
SDS (Natriumdodecylsulfat), Reinheit >85%	Merck
Trypan-Blau (0,4% Lsg.)	Sigma Aldrich
Trypsin	Invitrogen
Calcein-AM	Invitrogen
Propidium-Iodid	Fluka

4.1.4 Zelllinien

Für die Zell-Studien wurden verschiedene, etablierte Zelllinien eingesetzt, die auf Grund ihrer häufigen Verwendung gute Vergleichsmöglichkeiten zu anderen Zell-Studien zulassen.

4.1.4.1 HeLa

Weltweit werden für Zell-Studien bevorzugt HeLa-Zellen eingesetzt, unter anderem um die Vergleichsmöglichkeiten beizubehalten. Diese schnell proliferierende Zelllinie ist eine der ältesten immortalen, humanen Zelllinien [114]

und wurde aus dem Gebärmutterhalskrebs der 31-jährigen Afroamerikanerin Henrietta Laks nach deren Tod am 04. Oktober 1951 etabliert. Auf Grund der starken Mutationsrate wurden während der Zellstudien alle drei Monate neue Zellen aus der Master-Zell-Bank aufgetaut und in Kultur genommen. Geliefert wurden die Zellen zuvor vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen).

4.1.4.2 Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Multipotente Stammzellen wie hMSCs (human mesenchymal stem cells, hMSC) sind ebenfalls eine für Zell-Studien beliebte Zellart, die sich durch ein großes Differenzierungspotential auszeichnen. hMSCs lassen sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Osteoblasten (Knochenzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Adipozyten (Fettzellen) differenzieren [115]. Die für die Zellstudien verwendeten humanen hMSCs wurden aus Knochenmarkaspiraten oder Hüftgelenken mit der jeweiligen Einwilligung der Spenderperson gewonnen und von der Ethikkommission der Universitäten Ulm und Freiburg bewilligt.

4.1.4.3 SaOs-2

Die humane Osteoblasten SaOs-2 (osteogenic sarcoma) wurden 1973 aus dem Osteosarkom eines 11-jährigen, kaukasischen Mädchens etabliert. Die Osteoblasten wurden als Vergleich zu den undifferenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen herangezogen.

4.2 Durchführung

4.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator in entsprechenden Zellmedien und –kulturflaschen verwahrt. Dem zur Kultivierung von HeLa-Zellen eingesetzten Zell-Medium *Dulbecco´s Modified Eagles Medium* (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden 10% FCS (*fetal calf serum*, fötales Kälberserum, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 100 Einheiten Penicilin pro ml und 100 µg•ml⁻¹ Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Die Pflege der HeLa-Zellen umfasste wöchentlich ein dreimaliges Splitting der Zellkultur. Für die hMSCs wurde dem Zellmedium *Alpha MEM Eagle Medium* (α-MEM, Lonza, Köln, Deutschland) 20% FCS, 100 Einheiten Penicilin pro ml und 100 µg•ml⁻¹ Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1 mM Pyruvat (Sigma, München, Deutschland) und 0,6% Ciprofloxacin (Fluka, Buchs, Schweiz) zugegeben und die Zellkultur einmal wöchentlich gesplittet. Für die Osteoblasten SaOs-2 wurde dem Glutamin-freien Zellmedium *Dulbecco´s Modified Eagles Medium* (Dulbecco´s MEM, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) 10% FCS und 1% Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und die Zellkultur einmal wöchentlich gesplittet.

4.2.2 Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser

Zur Überprüfung und Normierung der Fluoreszenz-Intensitäten der verwendeten Partikeln wurde die Fluoreszenz-Intensität der jeweiligen Partikeln mittels Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser gemessen. Hierzu wurde der zu untersuchende Partikel mit einem Feststoffgehalt von 75 µg•ml⁻¹ in DPBS- (ohne Kalzium und Magnesium) resuspendiert und jeweils 100 µl in eine schwarze Styrol-Platte mit klarem Boden pipettiert. Als negative Kontrolle wurden 100 µl DPBS- mitgemessen. Die Messung erfolgte mit den gleichen Exzitations- und Emissionswerten wie am Durchflusszytometer. Die in dieser Dissertation verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe PMI und Bodipy wurden jeweils mit 488 nm

angeregt und die Emissionen bei 527 nm gemessen. Um die Daten der Durchflusszytometrie-Messungen auswerten zu können, müssen trotz des gleichen Fluoreszenz-Farbstoffes aufgrund des Herstellungsprozesses oder der eingesetzten Polymere unterschiedlich intensiv fluoreszierende Partikel normiert werden. Die Normierung der eingesetzten Partikel wurde wie folgt erreicht:

$$nFL_{PR} = FLI_{PR_Px} \cdot FLI_{PR_PS}^{-1}$$

$$nMFL_{Px} = MFLI_{FACS_Px} \cdot nFL_{PR}^{-1}$$

nFL_{PR} : Normierte Fluoreszenzintensität (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

FLI_{PR_Px} : Fluoreszenzintensität von Partikel x (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

FLI_{PR_PS} : Fluoreszenzintensität vom nicht-funktionalisierten Polystyrol-Partikel (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

$MFLI_{FACS_Px}$: Mittlere Fluoreszenzintensität von Partikel x (Durchflusszytometrie)

$nMFL_{Px}$: Normierte, mittlere Fluoreszenzintensität von Partikel x (Durchflusszytometrie)

Zur Erhaltung der normierten Werte wurden zunächst die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Partikel und eines Standard-Partikels (UPAA1; Poly(styrol-c/o-Acrylsäure)-Partikel; Tensid: SDS; Größe: 73 nm) als Referenz gemessen. Schließlich wurde jeweils die Fluoreszenz-Intensität der einzelnen Partikel mit der Fluoreszenz-Intensität des Referenz-Partikels verrechnet und der Normierungsfaktor in einem weiteren Schritt auf die Daten der Durchflusszytometrie-Messungen übertragen. Für die Darstellung der mit Bodipy-2 beladenen Nanopartikeln und der mit FITC beladenen Nanokapseln wurde die Normierung wie folgt durchgeführt:

$$nFL_{PR} = FLI_{PR_Px} \cdot FLI_{PR_NP1}^{-1}$$

$$nMFL_{Px} = MFLI_{FACS_Px} \cdot nFL_{PR}^{-1}$$

nFL_{PR} : Normierte Fluoreszenz-Intensität (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

FLI_{PR_Px} : Fluoreszenz-Intensität von Partikel x (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

FLI_{PR_NP1} : Fluoreszenz-Intensität von einem willkürlich ausgewählten Partikel/Kapsel innerhalb der Studie (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

$MFLI_{FACS_Px}$: Mittlere Fluoreszenz-Intensität von Partikel x (Durchflusszytometrie)

$nMFL_{Px}$: Normierte, mittlere Fluoreszenz-Intensität von Partikel x (Durchflusszytometrie)

Für die vergleichende Analyse aller Partikel hingegen wurden die einzelnen mittels Durchflusszytometrie gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten der mit PMI beladenen Nanopartikeln auf die mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenlesers gemessenen Eigenfluoreszenz der einzelnen Partikel nach folgender Formel normiert:

$$nMFL_{Px} = (MFLI_{FACS_Px} \cdot FLI_{PR_Px}^{-1}) \cdot 100$$

$nMFL_{Px}$: Normierte, mittlere Fluoreszenz-Intensität von Partikel x

FLI_{PR_Px} : Fluoreszenz-Intensität von Partikel x (Fluoreszenz-Mikrotiter-Plattenleser)

$MFLI_{FACS_Px}$: Mittlere Fluoreszenz-Intensität von Partikel x (Durchflusszytometrie)

Jede Messung erfolgte als Dreifach-Messung und für die Verrechnung wurde der Mittelwert eingesetzt.

4.2.3 Durchflusszytometrie

Die quantitativen Analysen der Nanopartikel- und Nanokapsel-Aufnahme in Säugetierzellen und die Zytotoxizitätsmessung wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden die adhärenenten Zellen zunächst trypsiniert, vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, zu jeweils $0,2 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in den Kavitäten (Wells) einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen sich wieder auf den Well-Böden adhärenenten konnten. Am 2. Tag wurde den Zellen der Fragestellung entsprechend Partikel mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zugegeben und anschließend 20 h inkubiert. Auf die Zugabe eines Transfektionsreagenzes wurde verzichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erst das Inkubationsmedium aus einzelnen Wells separat in 15 ml Falcons gesammelt, die Wells einmal mit DPBS⁻ gewaschen und schließlich 300 μl 0,5% Trypsin in die Wells gegeben. Nach 8 min hatten sich die Zellen vollzählig von den Böden der Wells gelöst und der Trypsinierungsprozess konnte mit 700 μl Zellmedium gestoppt werden. Die Zellsuspension wurde zu der zuvor gesammelten Flüssigkeit in den 15 ml Falcons gegeben und im Anschluss 4 min bei $450 \cdot g$ zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zell-Pellet einmal mit DPBS⁻ gewaschen und zentrifugiert. Für die Analyse der Aufnahme der Partikel in die Zelllinien wurde nun das jeweilige Zell-Pellet in 1 ml DPBS⁻ aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte mit dem Durchflusszytometer CyFlow ML von Partec und dem integrierten Messprogramm FloMax 2.6. Jede Probe wurde dreimal unabhängig gemessen und jeder einzelne Versuch zwei- bis dreimal durchgeführt. Die mittels FCS Express V3 erhaltenen Median-Werte wurden manuell in Excel übertragen und weiter ausgewertet.

Für den Toxizitätstest wurde dem jeweiligen Zell-Pellet im Rahmen der Zellaufbereitung für die Durchflusszytometrie-Analyse nach dem letzten Waschen mit DPBS⁻ 20 μl 7-AAD und 280 μl DPBS⁻ zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min im Dunklen. Nach der Inkubation wurde der Zell/7-AAD-Suspension 700 μl DPBS⁻ zugegeben, die Suspension bei $450 \cdot g$ 4 min zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Nach Zugabe von 1 ml DPBS⁻ wurde die Zell-Suspension in FACS-Röhrchen überführt und die Intensität des interkalierenden 7-AAD mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffs 7-AAD erfolgte mit 561 nm, die Emissionen wurden im FL6-Kanal (675 nm) gemessen. Für lebende Zellen zeigt sich keine Fluoreszenz und je poröser die Zelle ist, desto intensiver ist die Fluoreszenz-Intensität (siehe Abbildung 16).



Abbildung 16: Darstellung der Wirkungsweise des fluoreszierenden DNA-Farbstoffes 7-AAD.

Dabei wird die Eigenschaft von 7-AAD, nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen zu können, genutzt. Bei apoptotischen Zellen zersetzt sich die Zellemembran und bei toten Zellen liegt auch die Membran des Zellkerns in poröser Form vor, so dass 7-AAD hier zwischen die Cytosin- und Guanin-Basen der DNA interkalieren kann. Dementsprechend variiert die Intensität der Fluoreszenz. Nach einer Auswertung der Rohdaten mittels FCS Express V3 wurden die entsprechenden Prozentangaben für lebende, apoptotische und tote Zellen angegeben, der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt und die Zytotoxizität der jeweiligen Partikel dargestellt.

4.2.4 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop

Für fluoreszenzoptische qualitative Analysen der Nanopartikel- und Nanokapsel-Aufnahme in Säugetierzellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wurden die adhärenen Zellen zunächst trypsinisiert, vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, zu jeweils $0,02 \cdot 10^6$ Zellen pro IBIDI ausgesät und über Nacht im Inkubator ruhig gestellt, damit die Zellen sich wieder auf den IBIDI-Böden ausbreiten konnten. Am 2. Tag wurden den Zellen der Fragestellung entsprechend Partikel mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zugegeben und anschließend 20 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit 1 ml DPBS^- gewaschen und schließlich mit 1 ml DPBS^- gefüllt. Zum Anfärben der Zellmembran wurde $0,25 \mu\text{l}$ ($= 1,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) CellMaskOrange und für den Zellkern $0,25 \mu\text{l}$ ($= 12,5 \mu\text{M}$) DraQ5 dem $DPBS^-$ zugegeben. Nach Resuspendierung des Gemisches erfolgte die bildliche Erfassung mittels der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (*cLSM SP5 STED Leica Laser Scanning Confocal Microscope*, Leica, Deutschland). Die mit den grün fluoreszierenden Farbstoffen PMI oder Bodipy-2 versehenen Partikeln wurden bei 488 nm angeregt und bei 510 bis 540 nm detektiert. Die Emissionen des roten Membranfarbstoffes CellMaskOrange wurden nach einer Anregung mit 561 nm im Bereich von 585 nm erfasst. Der Zellkernfarbstoff DraQ5 weiterhin wurde mit 633 nm angeregt und die Emissionen im Bereich von 650 bis 750 nm detektiert. Die Messungen erfolgten mit einem HCX PL APO CS 63x/1,4-0,6 Öl-Objektiv und folgender Multi-Laser-Kombination: Ar-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$ (25% Laserleistung), 20 mW); DPSS ($\lambda = 561 \text{ nm}$, 20 mW); HeNe-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 10 mW).

5 Ergebnisse und Diskussion

Parameter wie die eingesetzte Polymere, das Alter der Nanopartikel, der Einfluss des FCS-Gehalts im Zellmedium, die Art der Herstellung, die Oberflächenfunktionalisierung und die Form haben einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf ihre Aufnahme in verschiedene Zelllinien. Dennoch entziehen sich die Art der Interaktionen zwischen den Nanopartikeln und –kapseln und den Zellen und deren Konsequenzen weitgehend unserem Verständnis. Im Folgenden wird systematisch die Aufnahme von verschiedenen Nanopartikeln und –kapseln und deren Wirkung in Säugetierzellen quantitativ mittels Durchflusszytometrie und qualitativ mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (cLSM) bestimmt. Dabei werden zunächst auf allgemeine Parameter, die die Aufnahme von Nanopartikel in HeLa-Zellen und hMSCs beeinflussen, eingegangen. Zum einen ist die Materialalterung von bioabbaubaren PLLA-Partikeln von Interesse, zum anderen der Einfluss des FCS-Gehalts im Zellmedium auf die Aufnahme von PMMA-Partikeln. Im nächsten Schritt wird der Fokus auf den Einsatz verschiedener, neu synthetisierter Tenside zur Stabilisierung von Nanopartikeln und deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme gelegt. Der Einfluss der Formmodifikationen von Nanopartikeln hinsichtlich der Verstreckung und Kristallisation von Polystyrol-Partikeln auf die Nanopartikel-Zelle-Interaktionen ist eine weitere Fragestellung, die im Rahmen dieser Arbeit behandelt wird. Die Darstellung der experimentellen Studien abschließend werden die zuvor auf Nanopartikeln bezogenen Fragestellungen teilweise erneut im Zusammenhang mit aus Proteinen hergestellten Biokapseln und mit PEG-MA (Polyethylenglykol-Methacrylat) untersucht. Das letzte Kapitel des Ergebnissteiles behandelt eine mit Hilfe einer neu eingeführten Datenbank zur Übersicht über die verwendeten Nanopartikeln eine vergleichende Analyse aller verwendeten Nanopartikeln mit dem Fluoreszenz-Farbstoff PMI.

5.1 Allgemeine Parameter, die die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln beeinflussen

5.1.1 Die Materialalterung von PLLA-Partikel und deren Einfluss auf die Aufnahme in Zellen

Ein nicht zu unterschätzender Parameter für die Nanopartikel-Zell-Interaktionen ist das Alter der eingesetzten Nanopartikel. In dieser Studie wurde zunächst die Aufnahme von frisch produzierten, bioabbaubaren PLLA- (Poly-L-Milchsäure, engl. *Poly-L-lactid*) Partikeln (RS281frisch) nach einer Inkubation von 20 h bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in HeLa-Zellen und hMSCs untersucht. Nach einer Lagerung der Partikel für 4 Wochen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Untersuchung unter denselben Bedingungen wiederholt. Da vermutet wird, dass während der Lagerung bei den PLLA-Partikeln die Hydrolyse einsetzt und dabei Nebenprodukte freigesetzt werden, wurde zur Beibehaltung der Versuchsbedingungen ein Teil der Partikel einer erneuten Dialyse unterzogen (RS281alt d.d.). Der andere Teil der Partikel wurde in seinem gegebenen Zustand belassen (RS281alt). Die Charakteristika der angeführten PLLA-Partikel sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten PLLA-Nanopartikel. (Synthese der Partikel von (...)) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz).

Bezeichnung	Monomer	Tensid	Zeta Potential ξ [mV]	Dialysiert	Durchmesser [nm]
RS281frisch	PLLA	SDS	-57.3 ± 12.3	Nach Herstellung	132 ± 41
RS281alt (4 Wochen)	PLLA	SDS	-47.4 ± 9.33	Nach Herstellung	131 ± 42
RS281alt d.d. (4 Wochen)	PLLA	SDS	-59.9 ± 11.7	Nach Herstellung/nach 4 Wochen	131 ± 44

Abbildung 17 zeigt TEM-Aufnahmen der verwendeten Nanopartikel. Deutlich ist zu erkennen, dass die Nanopartikel im Laufe der Zeit einem Veränderungsprozess unterliegen. Abbildung 17 A zeigt Partikel mit einer weitgehend gleichmäßigen Größenverteilung. Nach einer vierwöchigen Lagerung hat die durchschnittliche Größenverteilung der Partikel leicht abgenommen (siehe Abbildung 17 B). Dabei zeigen sich nach einer Größenkontrolle mittels der dynamischen Lichtstreuungsmessung (DLS) keine Unterschiede zwischen den im ursprünglichen Zustand belassenen (RS281alt) und den nach vier Wochen erneut dialysierten PLLA-Partikeln (RS281alt d.d.).

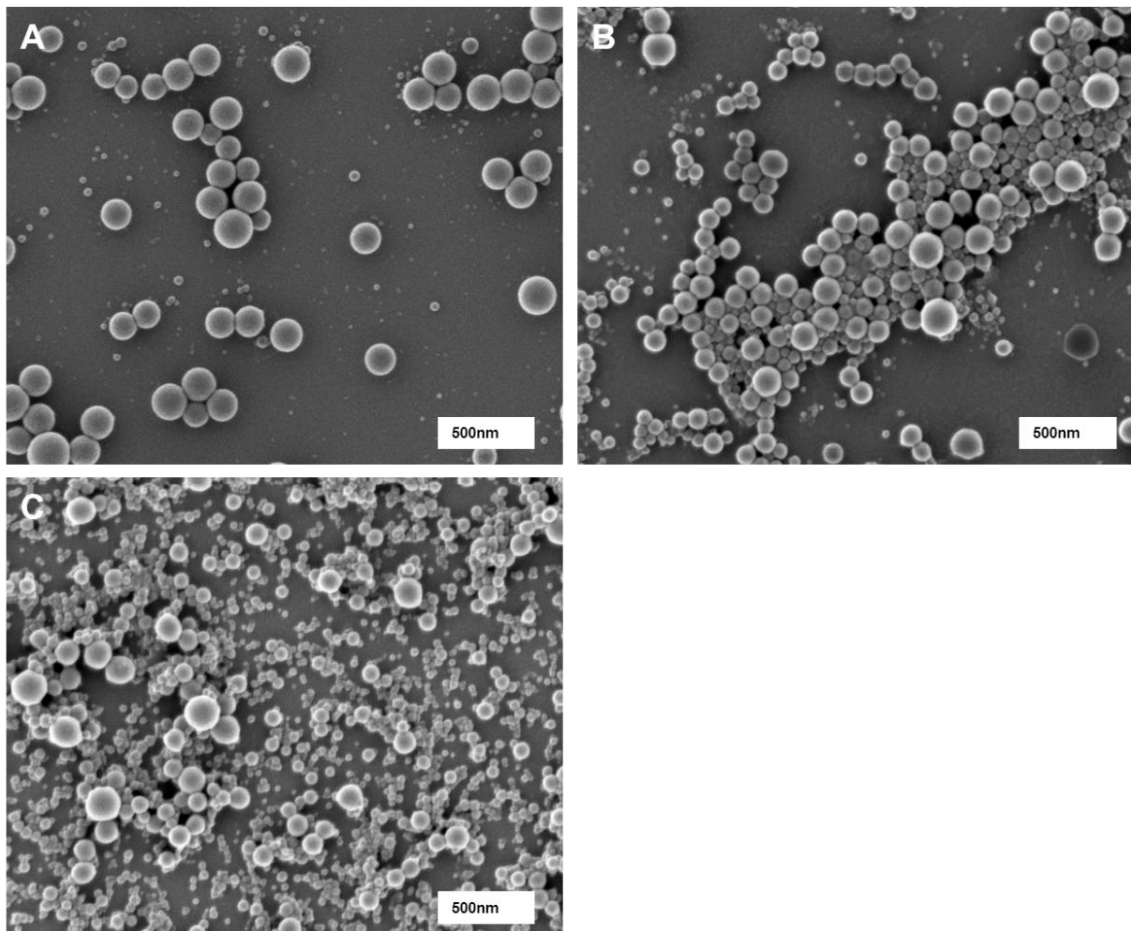


Abbildung 17: A: RS281frisch; B: RS281alt; C: RS281alt d.d. Die Partikel wurden von (...) (Max-Planck-Institut für Polymere Mainz) synthetisiert.

Die Analyse der Aufnahme und Toxizität der Partikel in HeLa-Zellen und hMSCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

5.1.1.1 Partikelaufnahme und Toxizität in der Durchflusszytometrie

Die Messungen im Durchflusszytometer zeigen, dass die frisch produzierten PLLA-Partikel eine höhere Aufnahme in die Zellen zeigen als die 4 Wochen alten Partikel. Hier zeigt sich, dass eine erneute Dialyse nach 4 Wochen keinen Einfluss sowohl auf die Aufnahme in die Zellen als auch auf die Toxizität zeigt. Die verminderte Aufnahme der 4 Wochen alten Partikeln könnte auf die Reduzierung der Kettenlängen während der Hydrolyse zurückgeführt werden. Dabei steigt durch die Erhöhung der Anzahl von Kettenenden die Hydrophilie und die zelluläre Aufnahme verschlechtert sich. Hydrolyse zurückzuführen Auch die frisch hergestellten PLLA-Partikel weisen keine toxische Wirkung auf die Zellen auf. Die Aufnahme der PLLA-Partikel in die beiden verwendeten Zelllinien HeLa-Zellen und hMSCs miteinander vergleichend, lässt den Schluss zu, dass die PLLA-Partikel von den HeLa-Zellen dreifach intensiver als von den hMSCs aufgenommen werden (siehe Abbildung 18). Davon abgesehen ist das Aufnahmeverhalten bei beiden Zelllinien gleich und eine Toxizität kann für keine Zelllinie nachgewiesen werden.

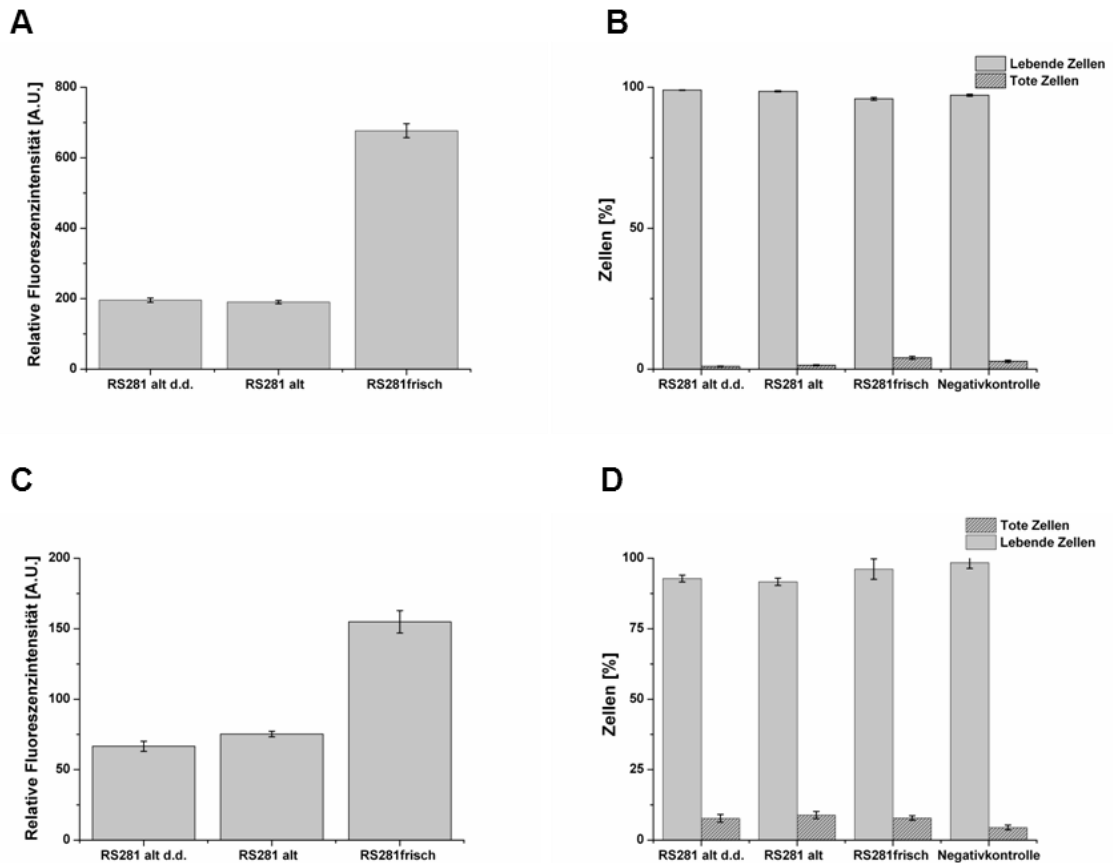


Abbildung 18: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von PLLA-Partikeln unterschiedlichen Alters in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.1.1.2 Partikelaufnahme im cLSM

Zur Verifizierung der mit Hilfe der Durchflusszytometrie-Analyse erzielten Ergebnisse und auch zum Ausschließen von auf der Zelloberfläche adsorbierten Nanopartikel wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Bilder repräsentativer Zellen erstellt. Die Bilder bestätigen die vorausgegangenen Ergebnisse (siehe Abbildung 19). Die frisch hergestellten Partikel RS281frisch wurden am effizientesten sowohl in die HeLa-Zellen als auch in die hMSCs aufgenommen. Zudem zeigte sich für die HeLa-Zellen eine sehr viel stärkere Aufnahme der Partikel als für die hMSCs. Auf der Zelloberfläche adsorbierte Partikel konnten für keine Zelllinie identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser

Studie sprechen für den Einsatz frisch hergestellter Nanopartikel, insbesondere bei abbaubaren Nanopartikeln wie PLLA-Partikeln.

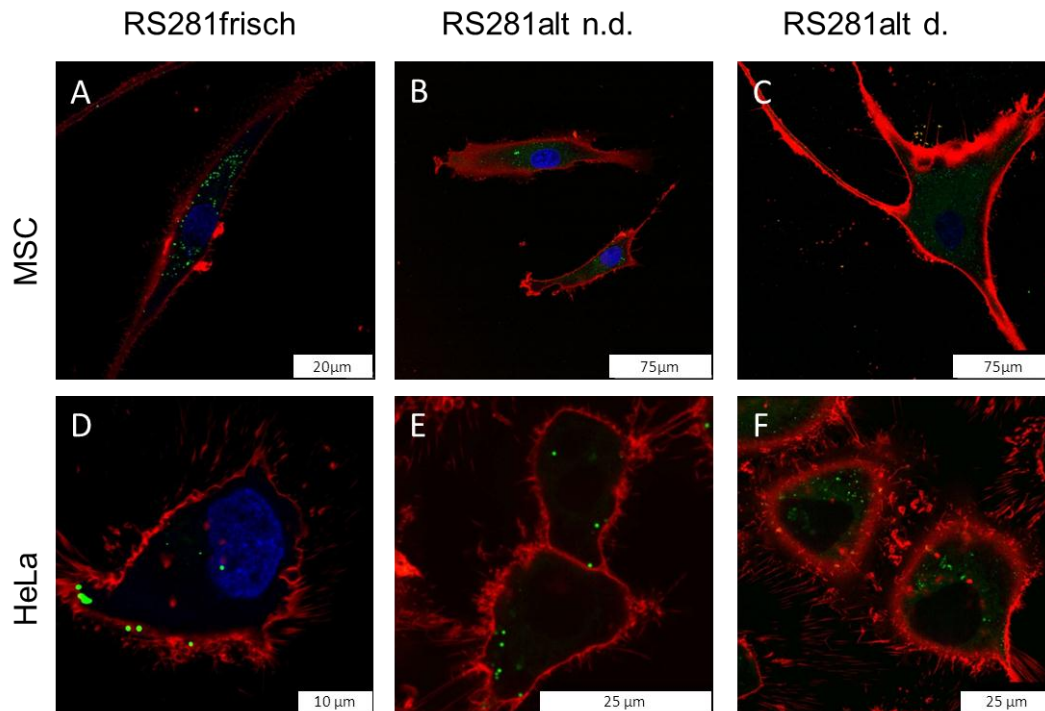


Abbildung 19: Intrazelluläre Aufnahmen von hMSCs (A-C) und HeLa-Zellen (D-F) nach 20 h Inkubation mit den Nanopartikeln RS281frisch (A, D), RS281alt (B, E), RS281alt d.d. (C, F) bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Partikel wurden alle dialysiert, wobei RS281 alt d.d. doppelt dialysiert wurde. Die Zellmembran wurde mit CellMask Orange (Rot) und der Zellkern mit DraQ5 (Blau) angefärbt. Die Nanopartikel sind grün (PMI) dargestellt.

5.1.2 Einfluss des FCS-Gehalts des Zellmediums auf die Zellaufnahme von PMMA-Partikeln

Die Studien zu Aufnahmen von Nanopartikeln in verschiedene Zelllinien erfolgt in der Regel in Versuchsreihen mit eukaryotischen Zellen aus Standard-Zellkulturen mit standardisierten Zellmedien. Diese enthalten neben Elektrolyte auch Aminosäuren, wichtige Nährstoffe und Proteine für die Zellen. Den verwendeten Zellmedien wird neben speziellen Zusätzen wie zum Beispiel Antibiotika regelmäßig fetales Kälberserum (*Fetal calf serum*, FCS) zugegeben [100, 116-

118]. FCS enthält neben etlichen anderen Aminosäuren, Wachstumsfaktoren und vielen noch nicht identifizierten Proteinen auch Kälberserumalbumin (*Bovine serum albumine*, BSA), bei dem von *Baier et al.* ein Einfluss auf die Partikelaufnahme in HeLa-Zellen nachgewiesen wurde [96]. Bekannt ist, dass die Partikel bei Kontakt mit biologischen Medien Interaktionen mit zahlreichen Proteinen eingehen [98]. Ein Verständnis für die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nanopartikeln, der Möglichkeiten der Ausbildung von einer Protein-Hülle (Corona) und deren Einfluss auf die Aufnahme der Partikel in Zellen ist bei den Untersuchungen zu Zell-Nanopartikel-Interaktionen von großer Bedeutung [90, 119]. Zudem sind die physikochemischen Eigenschaften von Nanopartikeln in einem repräsentativen Umfeld wie beispielsweise Zellmedien von großer Relevanz für die experimentelle Situation *in vitro*. Für diese Studie wurde der Einfluss des FCS-Anteils des Zellmediums auf die Aufnahme der von (...) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz) synthetisierten SDS-stabilisierten PMMA- (Polymethylmethacrylat) Nanopartikel mit einem Durchmesser von 120 nm (Abbildung 20 B) in HeLa-Zellen untersucht.

5.1.2.1 Analyse der Partikelaufnahme mittels Durchflusszytometer

Für die Untersuchung des Einflusses von FCS auf die Zellaufnahme wurden FCS-Konzentrationen des Inkubationsmediums von 0 bis 10% eingesetzt, die Nanopartikel mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 20 h mit den HeLa-Zellen inkubiert und die Analyse mittels Durchflusszytometer durchgeführt. Abbildung 20 A ist zu entnehmen, dass eine steigende FCS-Konzentration des Zellmediums einen inhibierenden Einfluss auf die Zellaufnahme der Nanopartikel hat. Die höchste Aufnahme konnte bei einer FCS-Konzentration von 0.05% verzeichnet werden. Ab einer FCS-Konzentration des Zellmediums von 5% können bis zu der FCS-Konzentration des Zellmediums von 10% keine Unterschiede bezüglich der Aufnahme der PMMA-4-Partikel in HeLa-Zellen erkannt werden.

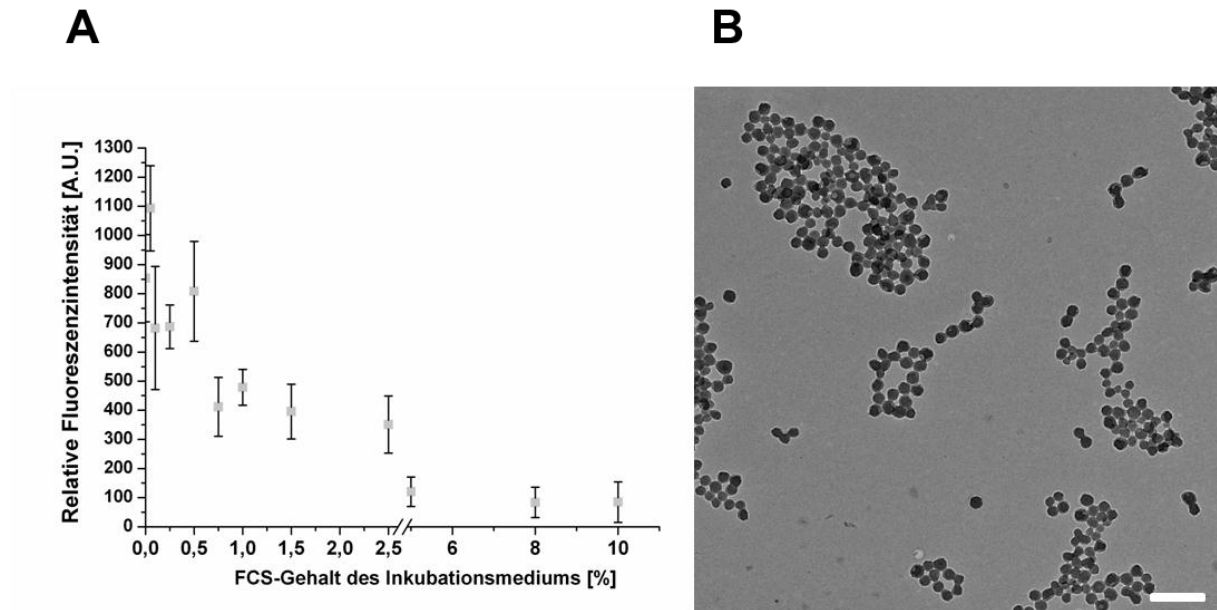


Abbildung 20: Aufnahme von PMMA-4-Partikel in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bei verschiedenen FCS-Konzentrationen des Inkubationsmediums (A). B zeigt ein TEM-Bild der PMMA-4-Partikel (Übernommen von Anita Höcherl). Der Größenbalken entspricht 500 nm.

Drescher et al. zeigen bei einer Untersuchung von Silica-Nanopartikeln, dass bei einer steigenden FCS-Konzentration des Zellmediums die Aggregation der Partikel und damit einhergehend die Toxizität für Fibroblasten steigt [95]. Bezüglich HeLa-Zellen und Polystyrol-Partikeln mit verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen konnte nach Zugabe von BSA ins Inkubationsmedium eine leichte Abnahme der Partikelaufnahme, jedoch kein Einfluss auf die Toxizität gezeigt werden [96]. *Baier et al.* untersuchte weiterhin die Veränderung im Durchmesser der eingesetzten Partikel vor und nach der BSA-Zugabe und konnte zeigen, dass BSA zu einer Größenzunahme der Partikel führt [96]. In diesem Zusammenhang ist zusätzlich bekannt, dass je nachdem, wie die verschiedenen saure oder basischen funktionelle Gruppen der Polystyrol-Partikel ausgeprägt sind, die Art der Proteine wie zum Beispiel HSA (Humanes Serumalbumin), IgG und IgM auf der Partikeloberfläche beeinflusst werden [98, 120]. Weitere Studien untersuchten die Abhängigkeit des Bindungsverhaltens

von nichtfunktionalisierten Polystyrol-Partikeln [121] und anderen Partikeln [90] von der zugegeben BSA-Menge. Die in dieser Untersuchung gezeigte starke Abnahme der Aufnahme von PMMA-Partikeln in HeLa-Zellen mit steigender Konzentration des FCS-Gehalts vom Zellmedium lässt vermuten, dass neben BSA auch andere Proteine in dem FCS-Cocktail eine Interaktion mit den PMMA-Partikeln eingehen, ihre Aggregation, Größenzunahme und Oberflächenfunktionalisierung in Form von Protein-Coronas beeinflussen. Die Abnahme der Aufnahmeeffizienz lässt sich vermutlich eher auf die damit einhergehende Größenzunahme der Polystyrol-Partikel erklären. Ein weiterer möglicher Grund für die abnehmende Aufnahmerate ist die Konkurrenz zu den anderen Proteinen oder Nährstoffen im FCS.

5.2 Zellaufnahme und Zytotoxizität von mit innovativen Tensiden stabilisierte Nanopartikel

5.2.1 Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel und deren Einfluss auf die Zellaufnahme und Zytotoxizität

Im Rahmen der Entwicklung neuer Nanopartikel als Transportelemente für biomedizinische Applikationen werden neue Materialien und auch neue Kombinationsmöglichkeiten von Materialien entwickelt, produziert und hinsichtlich ihrer Stabilität, ihrer Affinität zu Proteine, Zelloberflächen, ihrer Aufnahme in verschiedene Zelllinien und ihrer Toxizität untersucht. Die Entwicklung von Nanopartikeln bedarf einer Optimierung des Herstellungsprozesses. Für diese Studie wurde der Einsatz von „Surfmeren“ (Engl.: *surfactant and monomer*), von (...) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz) neu synthetisierte Monomere, die den Einsatz von Tensiden zur Stabilisierung der Nanopartikel während des Polymerisationsprozesses vermeidbar machen, untersucht. Der Einsatz von Surfmeren hat den Vorteil, den Stabilisierungsprozess während der Miniemulsion und die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel durch Vereinigung beider Prozesse in einem Schritt zu erreichen. Während konventionelle Tenside, wie z.B. Natriumdodecylsulfat (Engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) oder Natrium-Dodecylphosphonsäure (Engl.: *sodium dodecylphosphonic acid*, SDP), die Stabilität der synthetisierten Nanopartikel in der wässrigen Phase durch Adsorption gewährleisten, so dass die Sulfat- oder Phosphonatgruppen nicht kovalent an die Partikelhülle gebunden sind, werden Surfmeren während der Polymerisation in die Polymerhülle einpolymerisiert. Sie stabilisieren aufgrund ihrer Ladung die Nanopartikel elektrostatisch und ihre funktionellen Gruppen sind nach der Polymerisation kovalent an die Nanopartikel gebunden. Eine gewünschte Oberflächenfunktionalisierung erfolgt somit mit Hilfe der Surfmeren während des Polymerisationsprozesses, während nach der Polymerisation mit konventionellen Tensiden eine Oberflächenfunktionalisierung in einem weiteren Schritt erfolgen kann. Im Vergleich zu anderen funktionellen Monomere, wie z.B. Vinylphosphonat, liegen bei der Verwendung von Surfmeren aufgrund des amphiphilen Charakters die funktionellen Gruppen nahezu

ausschließlich an der Partikeloberfläche vor. (...) (Max-Planck-Institut für Polymere Mainz) stellte im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Vielzahl von Phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-Partikeln her, die mit Surfmern stabilisiert sind [26]. Als Vergleichssysteme wurden Polystyrol-Partikel mit der niedermolekularen (nicht kovalent angebundenen) Natriumdodecylphosphonsäure SDP stabilisiert. Um niedermolekulare Verbindungen zu entfernen, wurden die Partikel dialysiert (mit „d“ gekennzeichnet). Die Strukturformeln der eingesetzten neu synthetisierten Surfmere C11-PET und C12-PET sind Abbildung 21 zu entnehmen.

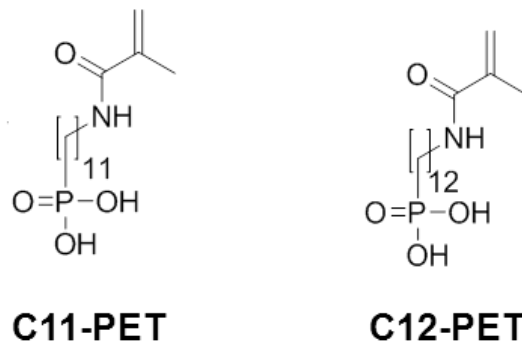


Abbildung 21: Strukturformeln der hergestellten „Surfmere“ C11-PET und C12-PET.

Eine Übersicht über die Charakteristika der einzelnen Partikel ist in der Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel, eingesetzter Initiator war für alle Partikel V59 (Synthese der Partikel von Rüdiger Sauer).

Bezeichnung	Monomer	Tensid	Anteil des Tensids	Dialysiert	Größe [nm]	PO ₃ ²⁻ -Gruppen pro Partikel•10 ⁴
PS-1 d.	Styrol	SDP	1.0	Ja	118	0,17
PS-4 d.	Styrol	SDP	2.0	Ja	98	0,19
PS-4 n.d.	Styrol	SDP	2.0	Nein	103	0,19
PS-2 d.	Styrol	C12-PET	1.0	Ja	114	0,39
PS-5 d.	Styrol	C12-PET	2.0	Ja	107	0,51
PS-5 n.d.	Styrol	C12-PET	2.0	Nein	114	0,51
PS-6 d.	Styrol	C11-PET	2.0	Ja	112	0,51

Die hergestellten Surfmerer (Tabelle 2; PS-2, PS-5, PS-6) bewirken genau wie das konventionelle Tensid SDP eine Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche mit Phosphonatgruppen. Der Nanopartikel PS-5 ist mit dem gleichen Surfmer C12-PET, aber dem doppelten Anteil wie der Nanopartikel PS-2 hergestellt worden. Der Vergleichspartikel PS-4 enthält ebenfalls den doppelten Anteil an SDP im Vergleich zu PS-1 und PS-6 wurde mit einem weiteren Surfmer C11-PET produziert. Im Gegensatz zu den nicht kovalent gebundenen Phosphonatgruppen nach dem Einsatz von SDP sind die Phosphonatgruppen nach dem Einsatz von Surfmeren kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. Die von Rüdiger Sauer synthetisierten Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel zeigen optisch eine sehr gleichmäßige Größenverteilung, die auch mittels einer dynamischen Lichtstreuungsmessung (DLS) bestätigt wurde (siehe Abbildung 22).

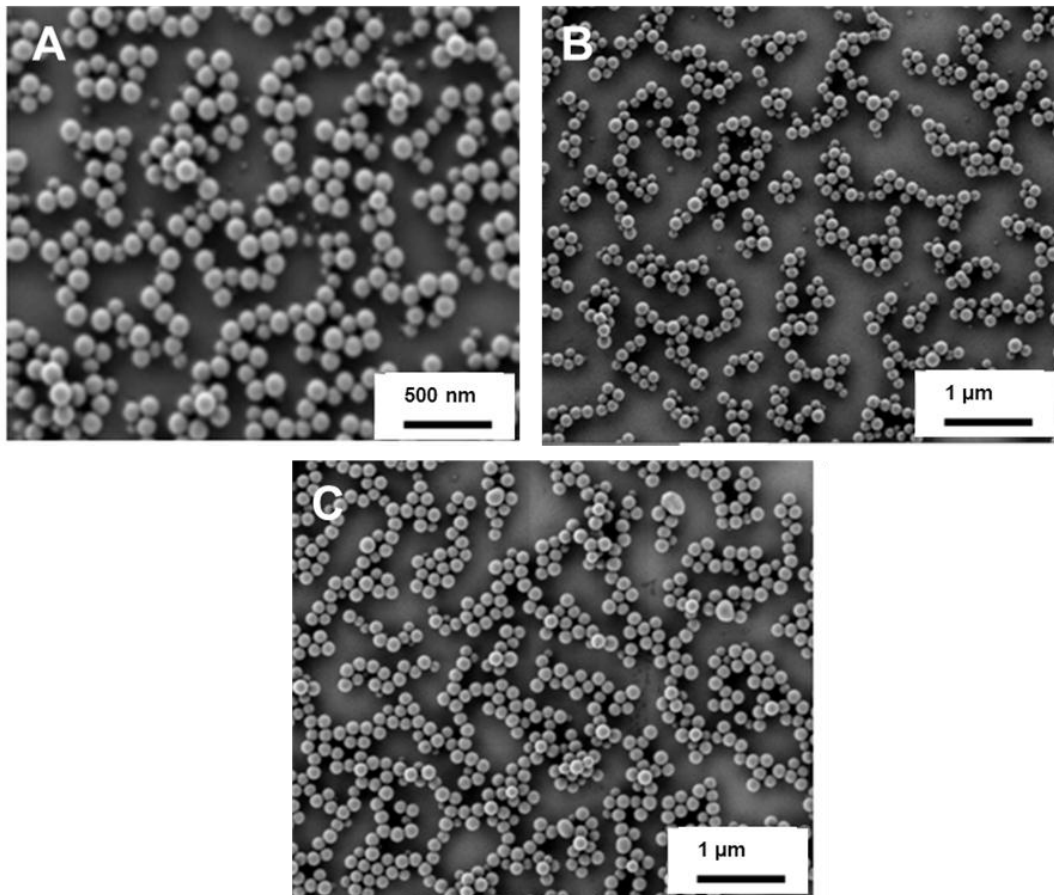


Abbildung 22: SEM-Aufnahmen von den synthetisierten Nanopartikeln mit C11-PET (A), SDP (B) und C12-PET (C) (Bilder wurden von Rüdiger Sauer aufgenommen).

Obwohl Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel von großem Interesse für biomedizinische Applikationsstudien, wie beispielsweise die Interaktionen zwischen den Nanopartikeln und Knochen, sind, sind nur wenige Studien zu Nanopartikeln mit Phosphonatgruppen auf der Oberfläche und deren zellulären Interaktionen bekannt [64, 96, 122-124]. Die Applikation von kovalent Phosphonat-funktionalisierten Nanopartikel eröffnet ein neues Gebiet für die Entwicklung von neuen, biologisch abbaubaren Partikeln, die durch die Miniemulsionspolymerisation entwickelt werden können, eine gute zelluläre Aufnahme zeigen und eventuell für einen gezielten Wirkstofftransport eingesetzt werden können. Während bei der Verwendung von SDP eine Desorption des Tensides, eine damit einhergehende Destabilisierung der Nanopartikel und damit

toxische Antworten der Zelle zu erwarten sind, werden bei kovalent eingebauten Phosphonaten keine negativen Einflüsse zu beobachten sein. Nanopartikel mit kovalent eingebauten Phosphonaten bleiben stabil. Weiterhin sind die kovalent Phosphonat-funktionalisierten Partikel interessant für den Einsatz bei der Entwicklung von metallischen Prothesen mit einer guten Kompatibilität zum menschlichen Organismus [125, 126]. Für die Untersuchung der Partikel-Zell-Interaktionen ist der Einsatz von Nanopartikeln mit Phosphonatgruppen auf der Oberfläche ohne zytotoxische Eigenschaften ebenfalls von Interesse. Für die folgende Untersuchung wurde die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität von kovalent und nicht kovalent Phosphonat-funktionalisierenden Nanopartikeln in zwei verschiedenen menschlichen Zelllinien, einer Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie (HeLa-Zellen) und in hMSCs, untersucht. Die Zellen wurden 20 h mit einer Konzentration von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fluoreszierender PMI-beladener Nanopartikel inkubiert.

5.2.1.1 Toxizität der Tenside Natrium-Dodecylphosphonsäure und Natrium-Dodecylsulfat

Zunächst sollte die Zytotoxizität des eingesetzten Tensids SDP bestimmt werden. Der zytotoxische Effekt des Tensids SDP ist im Gegensatz zu dem zytotoxischen Effekt des Tensids Natrium-Dodecylsulfat (SDS) [127] in der Literatur nicht bekannt. Die Strukturformeln der beiden Tenside sind Abbildung 23 zu entnehmen.

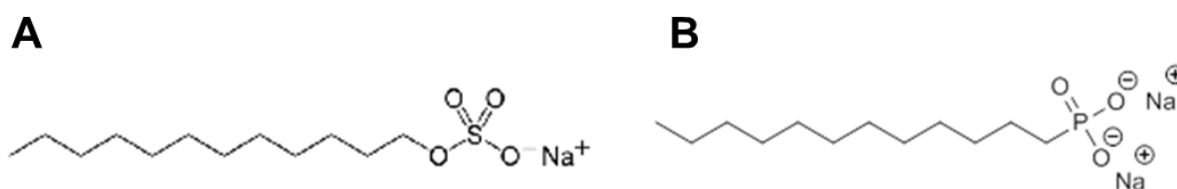


Abbildung 23: Strukturformeln der Tenside Natriumdodecylsulfat (A; SDS) und Dinatriumdodecylphosphonat (B; SDP).

Um die toxische Höchstkonzentration für das Tensid SDP ermitteln und die Differenz zwischen kovalent gebundenen und nichtkovalent gebundenen Phosphonatgruppen nachweisen zu können, wurde eine vergleichende Analyse durchgeführt und als Referenz das Tensid SDS verwendet. HeLa-Zellen wurden jeweils 20 h mit verschiedenen Konzentrationen ($8 \cdot 10^{-5} \%$ ($0.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) bis $0,4\%$ ($4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)) der beiden Tenside SDP und SDS inkubiert und im Anschluss mit einem fluoreszierenden, membrandurchlässigen Farbstoff für lebende Zellen (Calcein) und dem fluoreszierenden, membranundurchlässigen Farbstoff für tote Zellen Propidium-Iodid gefärbt. Propidium-Iodid färbt ausschließlich tote Zellen mit einer instabilen, porösen Zellmembran durch Bindung an die DNA an. Die Analyse der Fluoreszenz-Intensitäten erfolgte mit dem Fluoreszenz-Plattenleser. Die Toxizität liegt für das Tensid SDP bei einer Konzentration höher als $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ und für das Tensid SDS bei einer Konzentration von $0.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Dies zeigt, dass SDP eine leicht geringere Toxizität als SDS aufweist (siehe Abbildung 24).

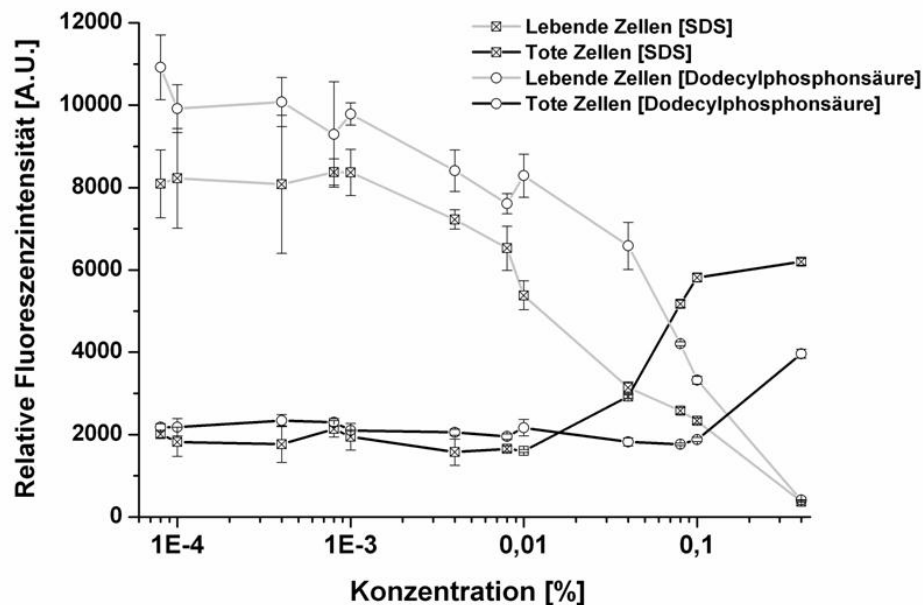


Abbildung 24: Effekt von verschiedenen Konzentrationen der Tenside Natriumdodesylsulfat (SDS) und Natriumdodecylphosphonsäure (SDP) auf die Viabilität (Hellgrau, Färbung mit Calcein) und Toxizität (Dunkelgrau, Färbung mit Propidium-Iodid) von HeLa-Zellen nach einer 20 stündigen Inkubation. Die Fluoreszenz-Intensitäten der lebenden und toten Zellen wurden mit einem Fluoreszenz-Plattenleser gemessen.

5.2.1.2 Partikelaufnahme und Toxizität im Durchflusszytometer

Die Aufnahme und Toxizität der Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel wurde nach einer zwanzigstündigen Inkubation mit dem Durchflusszytometer gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten mit dreifachen Ansätzen. Um die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Partikel miteinander vergleichen zu können, wurde eine Normierung auf den Fluoreszenzwert eines ausgewählten Partikels durchgeführt (siehe Kapitel 4.2). Der Grund für die Normierung liegt in der Tatsache, dass der Fluoreszenzfarbstoff PMI in Polymeren zu einer Aggregation neigen und währenddessen seine Fluoreszenz-Intensität ändern [128, 129] kann. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des Membranfarbstoffs 7-Aminoactinomycin-D (7-AAD) untersucht. 7-AAD hat die Eigenschaft, nur durch die poröse Membran apoptotischer oder toter Zellen eindringen zu können. Abbildung 25 A zeigt ähnliche Aufnahmemuster für mit Surfmere hergestellte (PS-2, PS-5, PS-6) und SDP-stabilisierte (PS-1, PS-4) Nanopartikel in HeLa-Zellen. Alle Nanopartikel, deren detaillierte Partikelbeschreibung der Tabelle 2 zu entnehmen ist, werden gut von den HeLa-Zellen aufgenommen. Zusätzlich wurde die zelluläre Aufnahme der kovalent funktionalisierten Phosphonat-Nanopartikel PS-5 und der SDP-stabilisierten, nicht kovalent funktionalisierten Nanopartikel PS-4 vor (n.d., nicht-dialysiert) und nach (d., dialysiert) der Dialyse miteinander verglichen. Mit Hilfe der Dialyse gereinigte Partikel zeigen keine signifikanten Unterschiede bei der zellulären Aufnahme in HeLa-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen die nicht-dialysierten SDP-stabilisierten Nanopartikel PS-4 n.d. eine ungefähr um dreißig Prozent stärkere Aufnahme in die Zellen als die dialysierten SDP-stabilisierten Nanopartikel PS-4 d. Für die dialysierten Nanopartikel konnte keine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen werden. Die nicht-dialysierten Nanopartikel zeigen dagegen mit ungefähr 10% eine geringe Toxizität für die HeLa-Zellen siehe (Abbildung 25 B).

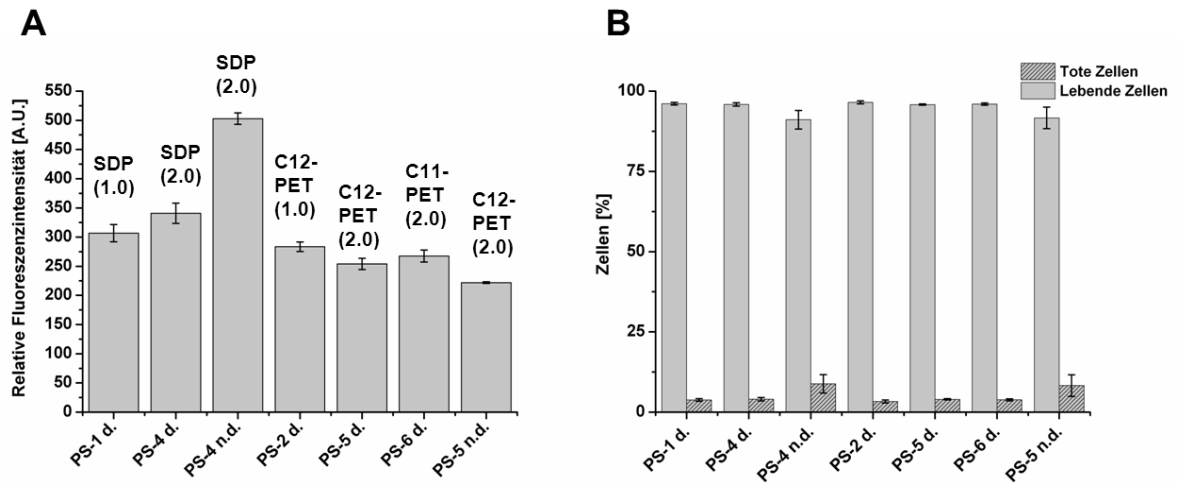


Abbildung 25: Aufnahme (A) und Viabilität (B) von Phosphonat-funktionalisierten (PS-2, PS-5, PS-6) oder mit SDP stabilisierten (PS-1, PS-4) Nanopartikeln in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ der fluoreszierenden (PMI) Nanopartikel. Der Reingehalt der Partikel wird mit d. für dialysierte Partikel und n.d. für nicht-dialysierte Partikel angezeigt. In Klammern ist der Anteil des Tensids dargestellt.

Für die humanen hMSCs konnte das gleiche Aufnahmemuster mit den kovalent und nicht-kovalent Phosphonat-funktionalisierten Nanopartikeln nachgewiesen werden. Insgesamt ist die Aufnahme bei den MSCs deutlich geringer (Abbildung 26 A). Eine Zytotoxizität konnte weder für die dialysierten noch für die nicht-dialysierten Partikel gezeigt werden (Abbildung 26 B).

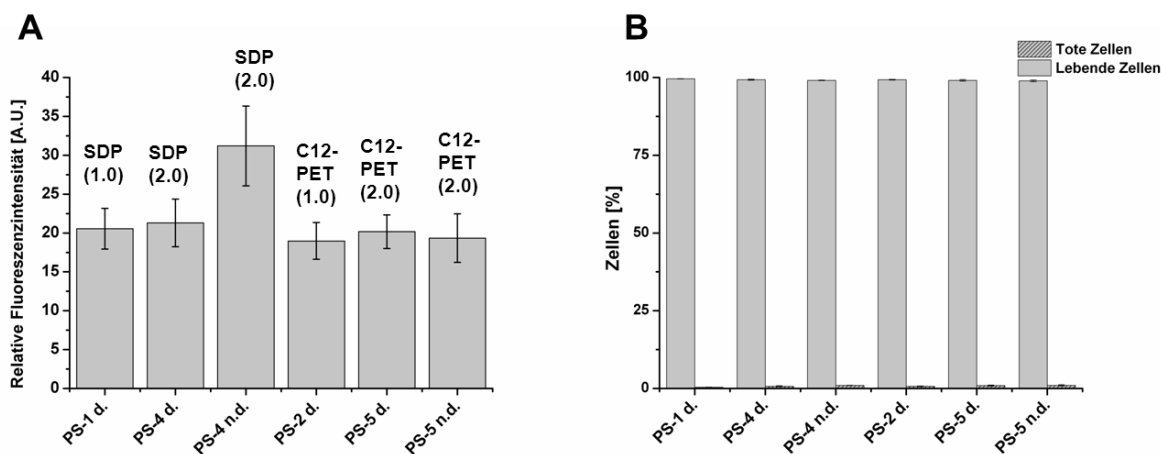


Abbildung 26: Aufnahme (A) und Viabilität (B) von Phosphonat-funktionalisierten (PS-2, PS-5) oder mit SDP stabilisierten (PS-1, PS-4) Nanopartikeln in hMSCs nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ der fluoreszierenden (PMI) Nanopartikel. Der Reingehalt der Partikel wird mit d. für dialysierte Partikel und n.d. für nicht-dialysierte Partikel angezeigt. In Klammern ist der Anteil des Tensids dargestellt.

5.2.1.3 Partikelaufnahme im LSM

Zur Beantwortung der Frage, ob die Nanopartikel ins Zellinnere gelangen oder auf der Zelloberfläche adsorbiert werden, wurde die Aufnahme der Nanopartikel in HeLa-Zellen und hMSCs mit Hilfe von konfokalen Laser-Scanning-Studien untersucht. Die aufgenommenen Bilder (Abbildung 27) zeigen die Aufnahme der mit Hilfe von eingesetzten Surfmere Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel PS-5 d. (C12-PET) und PS-6 d. (C11-PET) nach einer Inkubationszeit von zwanzig Stunden mit einem Feststoffgehalt der eingesetzten Nanopartikel von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in vesikuläre Strukturen und ihre Verteilung im Zytosol von HeLa-Zellen. Außerhalb der Zellen konnten keine Nanopartikel detektiert werden.

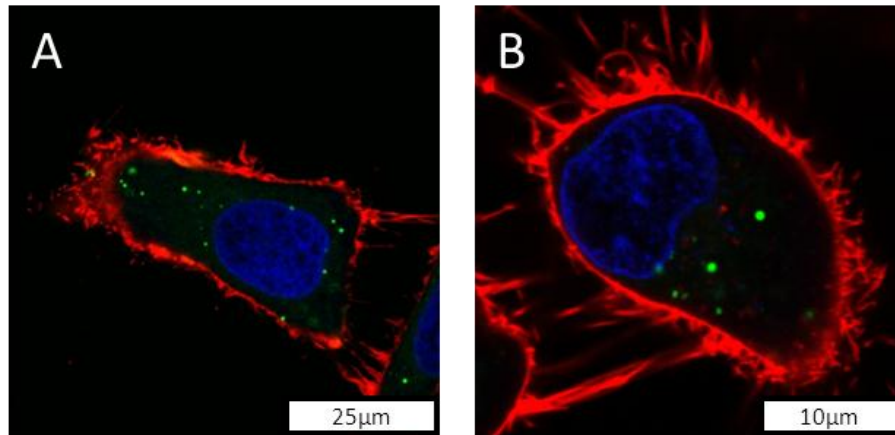


Abbildung 27: Intrazelluläre Aufnahmen von HeLa-Zellen nach einer 20 h Inkubation mit den Nanopartikeln PS-5 d. (A; C12-PET (2.0)) und PS-6 d. (B; C11-PET (2.0)) bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Partikel wurden dialysiert (d.). Die Zellmembran wurde mit CellMask Orange (Rot) und der Zellkern mit DraQ5 (Blau) angefärbt. Die Nanopartikel sind grün (PMI) dargestellt.

Abbildung 28 zeigt in einem weiteren Durchgang die Aufnahme der SDP-stabilisierten (Abbildung 28 A, B, E, F) und mit Surfmere hergestellten (Abbildung 28 C, D, G, H) Nanopartikel in hMSCs (Abbildung 28 A bis D) und HeLa-Zellen (Abbildung 28 E bis H) nach einer Inkubationszeit von zwanzig Stunden mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ im Vergleich. Deutlich ist die stärkere Aufnahme der Nanopartikel in HeLa-Zellen im Vergleich zur Aufnahme der Nanopartikel in hMSCs zu erkennen. Mit dieser Beobachtung lassen sich die Daten aus der Durchflusszytometer-Studie bestätigen (Abbildungen 25 und 26). Die Nanopartikel wurden ins Zytosol der Zellen aufgenommen und liegen außerhalb der Zellen nicht vor.

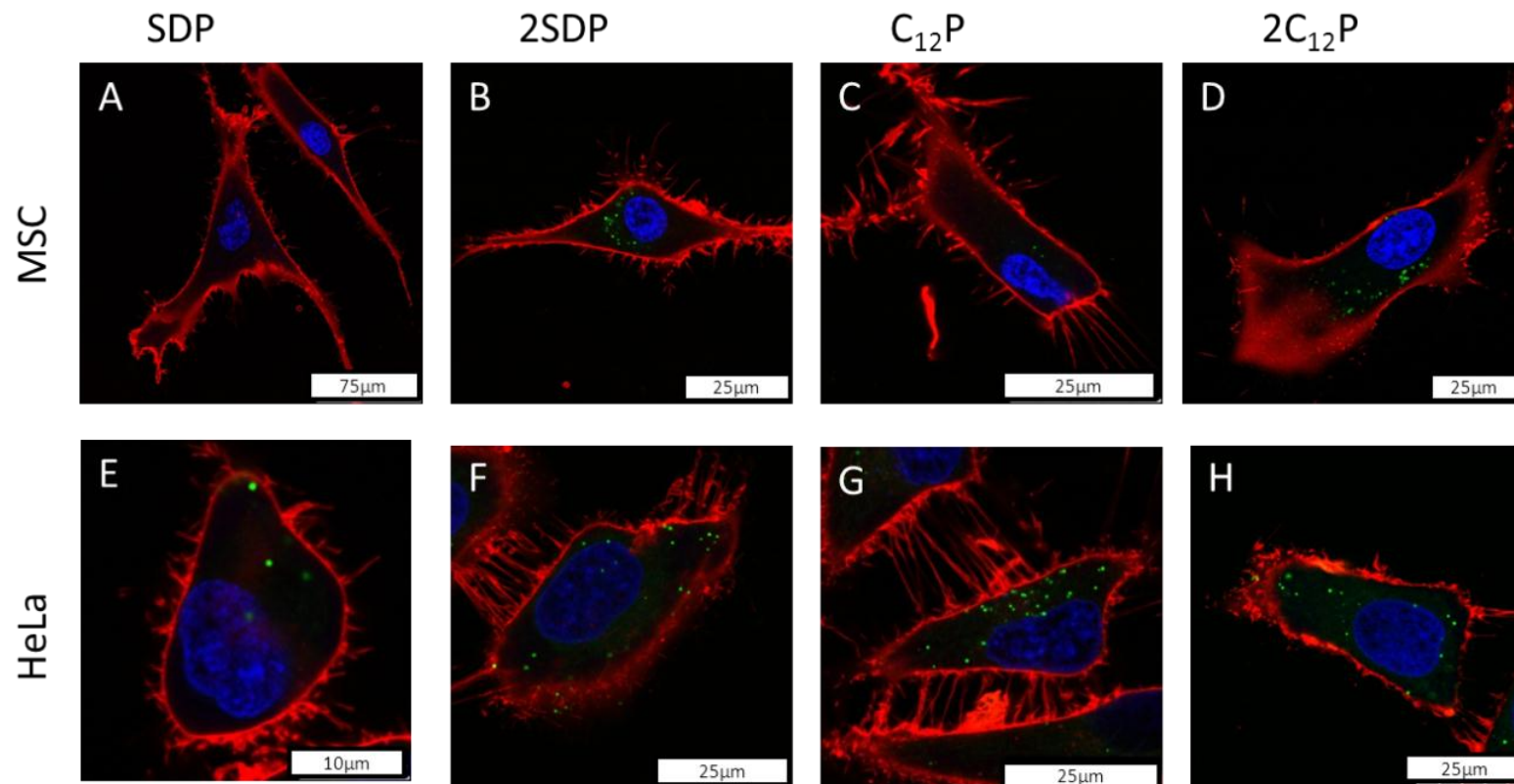


Abbildung 28: Intrazelluläre Aufnahmen von hMSCs (A-D) und HeLa-Zellen (E-H) nach einer 20 stündigen Inkubation mit den Nanopartikeln PS-1 d. (A, E), PS-4 d. (B, F), PS-2 d. (C, G) und PS-5 d. (D, H) bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Zellmembran wurde mit CellMask Orange (Rot) und der Zellkern mit DraQ5 (Blau) angefärbt. Die Nanopartikel sind grün (PMI) dargestellt.

Die Ergebnisse stimmen mit anderen Studien, bei denen Phosphonat-funktionalisierte Nanopartikel eine gute Aufnahme in dendritische Zellen [130] und hMSCs [131] zeigen, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu haben, überein. Phosphonat-funktionalisierte Partikel haben zudem keinen Einfluss auf die Zell-Proliferation und -Aktivität [131, 132]. Somit konnte gezeigt werden, dass Partikel mit kovalent angebondenen Phosphonatgruppen ohne zusätzliche niedermolekulare Tenside eine sehr gute zelluläre Aufnahme zeigen und sehr geeignete Kandidaten für biomedizinische Anwendungen darstellen.

5.2.2 Biokompatible, durch HPMA-LMA-Copolymere stabilisierte Polystyrol- und PLLA-Partikel

Nachdem in dem vorausgegangenen Kapitel der Einfluss von durch Comonomer kovalent angebondenes Phosphonat auf die zelluläre Aufnahme beschrieben wurde, geht es in diesem Kapitel um die Möglichkeit der Vermeidung des in hohen Konzentrationen zytotoxischen Tensids SDS durch Polymer-stabilisierte Partikel. Dazu wird ein alternatives, biokompatibles und zugleich anionisches Tensid benötigt, damit die Möglichkeit, in wässrigen Medien zu arbeiten, erhalten bleibt. Dieses tensidisch wirkende Copolymer sollte zudem vorzugsweise Eigenschaften nach Ringsdorfs Konzept haben. Das Konzept nach Ringsdorf besagt, dass verschiedene Komponenten an ein Polymerrückgrat mittels eines Verbindungsstücks beziehungsweise Sollbruchstelle gekoppelt werden sollten. Die Sollbruchstelle gewährleistet eine erfolgreiche Freisetzung des eventuell an das Polymer gekoppelten Medikaments im gewünschten Zielgewebe [30]. Zur Erreichung dieses Ziels wurden von Annette Kelsch im Rahmen ihrer Diplomarbeit biokompatible Nanopartikel mit Hilfe der von *Duncan et al.* entwickelten Poly-((N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA))-basierten Tensiden synthetisiert [133-135]. Als hydrophober Block wurde Laurylmethacrylat (LMA) verwendet, damit die Partikel in der Dispersion stabilisierende, amphiphile Systeme entstehen. LMA wurde neben der Verwendung für die Synthese von Block-Comonomere ebenfalls zur Synthese von statistischen Co-Monomeren

eingesetzt. Die Strukturformel des synthetisierten Polymers ist Abbildung 29 und die Partikeleigenschaften der Tabelle 3 zu entnehmen.

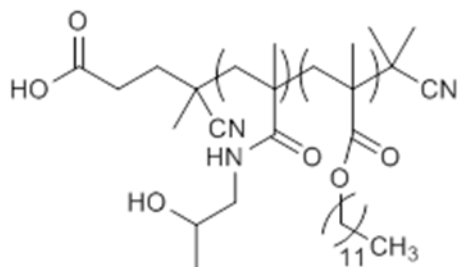


Abbildung 29: Strukturformel von Poly-((N-(2-hydroxypropyl) methacrylamid/Laurylmethacrylat (HPMA/LMA).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Nanopartikel, eingesetzter Initiator war für alle Partikel V59 (Synthese der Partikel von Annette Kelsch). Das ermittelte Zeta-Potential lag im Bereich von -20 bis -40mV.

Interne Nomenklatur	Bezeichnung	Monomer	Copolymer	Struktur	Größe [nm]
AK2-5	PS-H/L-b	Styrol	HPMA/LMA	Block	300
AK2-6	PS-H/L-s	Styrol	HPMA/LMA	Statistisch	400
AK2-7	PLLA-H/L-s	PLLA	HPMA/LMA	Statistisch	500
AK2-8	PLLA-H/L-b	PLLA	HPMA/LMA	Block	500-600
AK2-9	PP-H/L-s	P(HPMA)40-co-P(LMA)40	HPMA/LMA	Statistisch	220

Die HPMA-basierten Trägersysteme haben den Vorteil, dass die Verkapselung von festen, flüssigen, anorganischen, organischen, hydrophile oder hydrophobe Materialien ermöglichen [136]. Dabei können komplexe Nanopartikel ausgebildet werden. HPMA-basierte Trägersysteme werden bereits in der Tumorthherapie für

meist wasserunlösliche Chemotherapeutika eingesetzt und in der klinischen Phase II evaluiert [137]. Der zuvor beschriebene „EPR-Effekt“ (Kapitel 3.2.5) spielt hierbei eine tragende Rolle. Im Rahmen dieser Studie soll die Bioverträglichkeit des neuentwickelten, alternativen Tensids und deren Affinität gegenüber HeLa-Zellen und hMSCs untersucht werden. Die neuartigen, biokompatiblen, durch HPMA-LMA stabilisierten PS- und PLLA-Nanopartikel wurden in den Zellversuchen hinsichtlich ihrer Aufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs und ihrer Zytotoxizität analysiert.

5.2.2.1 Partikelaufnahme und Toxizität im FACS

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Aufnahme der verschiedenen Partikel in HeLa-Zellen und hMSCs quantitativ untersucht. Die dabei zum Einsatz kommenden Nanopartikel haben entweder eine unterschiedliche Struktur oder bestehen aus verschiedenen Materialien. Die Partikel PS-H/L-b und PS-H/L-s, aus Styrol und HPMA/LMA hergestellt, verfügen über verschiedene Strukturen. PS-H/L-b hat eine Block- und PS-H/L-s eine statistische Struktur. Für die Herstellung der Partikel PLLA-H/L-s und PLLA-H/L-b kamen PLLA und HPMA/LMA zum Einsatz. PLLA-H/L-s hat eine statistische und PLLA-H/L-b eine Block-Struktur. Der Partikel PP-H/L-s besteht nur aus HPMA/LMA und hat eine statistische Struktur. Der Einsatz des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs 7-AAD ermöglichte zusätzlich die Untersuchung der Zytotoxizität. Bis auf den Partikel PS-H/L-s (2-6) zeigen die eingesetzten HPMA-stabilisierten Partikel eine gute Aufnahme sowohl in HeLa-Zellen (Abbildung 30 A) als auch in hMSCs (Abbildung 30 C). Die höchste Aufnahme in HeLa-Zellen zeigt der von den eingesetzten Nanopartikeln kleinste Nanopartikel PP-H/L-s. Dabei scheint in diesem Fall die Partikelaufnahme bei den HeLa-Zellen mehr von der Größe als vom verwendeten Polymer oder Tensid beeinflusst zu werden. Bei den hMSCs wird die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere vermutlich mehr von den Oberflächeneigenschaften der eingesetzten Partikel bestimmt. Eine

Zytotoxizität konnte sowohl für die HeLa-Zellen (Abbildung 30 B) als auch für die hMSCs (Abbildung 30 D) nicht festgestellt werden.

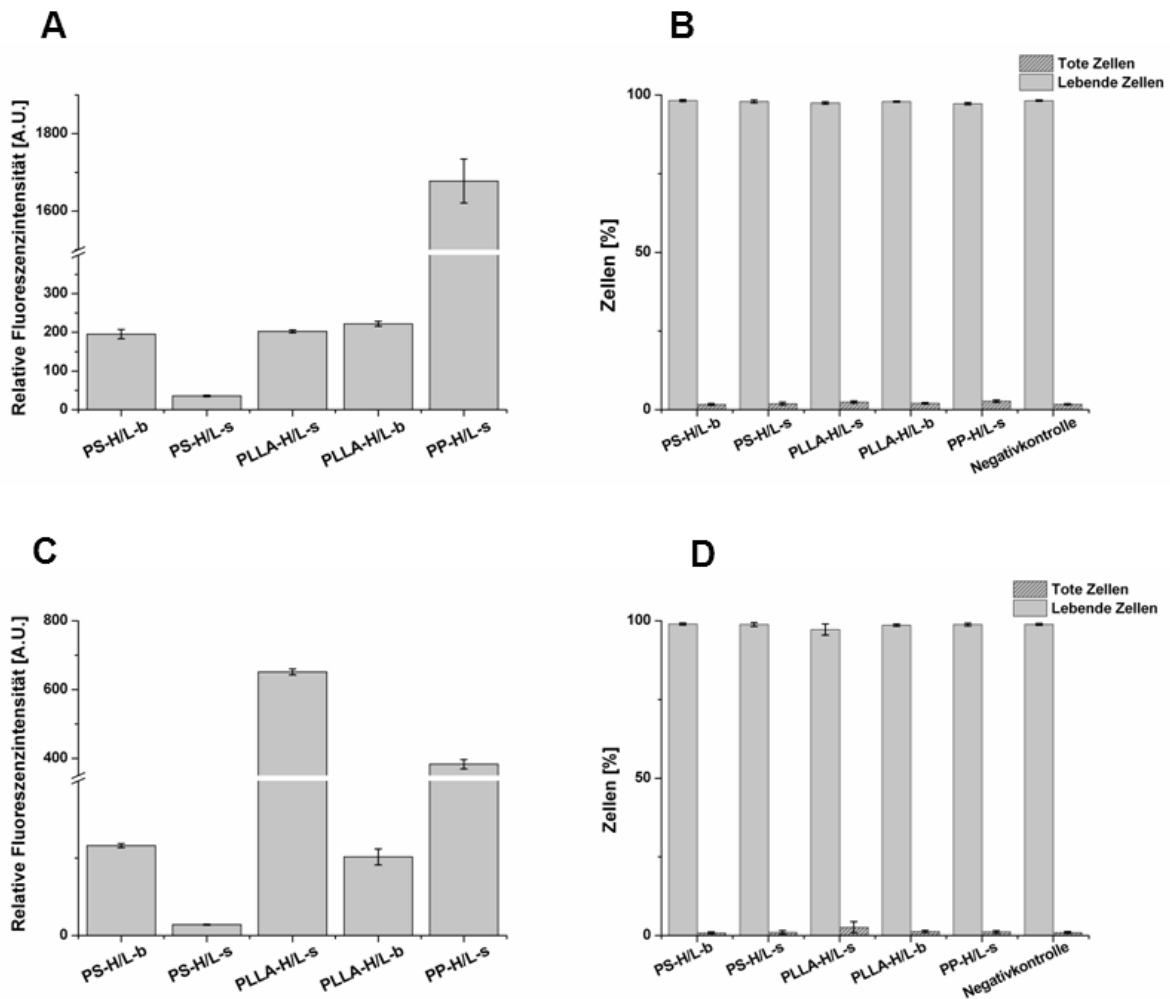


Abbildung 30: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von Nanopartikeln in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.2.2.2 Partikelaufnahme im cLSM

Zur Verifizierung der zuvor mit Hilfe der Durchflusszytometrie erstellten Ergebnisse wurden Bilder mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (cLSM) angefertigt. Die cLSM-Bilder bestätigen die im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Ergebnisse. Für den Partikel PLLA-H/L-s (2-7) zeigt sich, dass

dieser inner- und außerhalb von Zellen stark mit anderen Partikeln aggregiert (Abbildung 31 A). Der Partikel PP-H/L-s (2-9) wird von beiden Zelllinien sehr gut aufgenommen, der Partikel PLLA-H/L-s (2-7) hingegen mehr von den hMSCs.

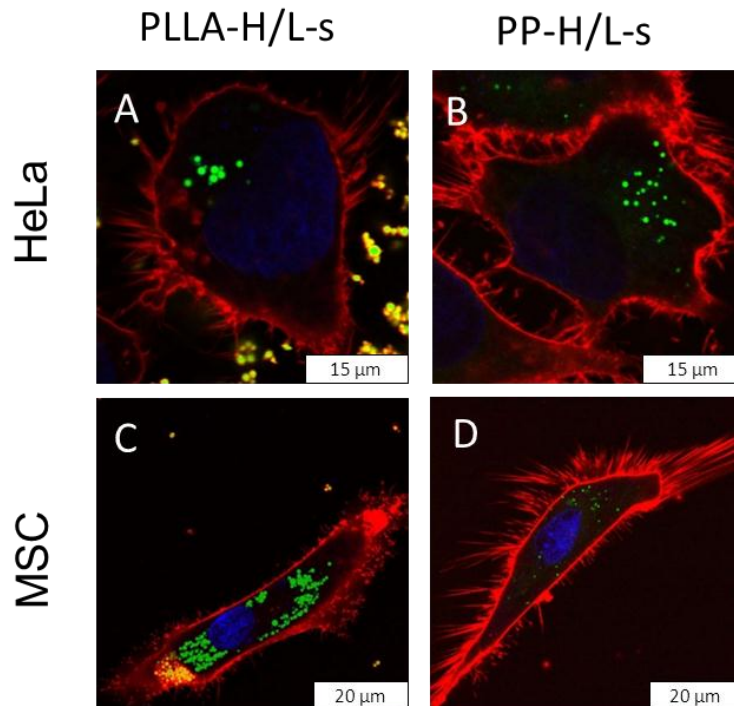


Abbildung 31: Aufnahme von Nanopartikel in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Partikel (PMI) erscheinen grün, die Zellmembran rot (CellMaskOrange) und der Zellkern blau (DraQ5).

Die Ergebnisse unterstützen die in der Literatur publizierten Aussagen, nach denen HPMA-Trägersysteme eine sehr geringe Zytotoxizität aufweisen und dementsprechend ein großes Potential für biologische Applikationen zeigen [138]. Ihr Einsatz als Copolymere fördert die Aufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs. Einzig der Polystyrolpartikel PS-H/L-s mit einer statistischen Struktur wird sowohl von den HeLa-Zellen als auch von den hMSCs in geringem Ausmaß aufgenommen. Der Polystyrolpartikel mit einer Block-Struktur PS-H/L-b und der Partikel PLLA-H/L-b werden von beiden Zelllinien gleichermaßen gut

aufgenommen. Für weitere Untersuchungen sind Modifikationen der mit HPMA/LMA stabilisierte Nanopartikel von Interesse, auch um der Überlegung, ob die Aufnahme bei den HeLa-Zellen in der Tat von der Größe und bei den hMSCs von den Oberflächeneigenschaften der Partikel beeinflusst werden, nachgehen zu können. Die Ergebnisse mit dem Partikel PP-H/L-s (2-9) zeigen zudem, dass die nur aus den Polymeren HPMA/LMA bestehenden Partikeln gut von den HeLa-Zellen und hMSCs aufgenommen werden und somit neue Modelle für Applikationsstudien darstellen könnten. So könnten verschiedene Oberflächenfunktionalisierungen, Größenvariationen etc. zur Optimierung der zielgerichteten Zellaufnahme eingeführt werden.

5.3 Zelle-Nanopartikel-Interaktionen und Zytotoxizität von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Formen und Materialeigenschaften

5.3.1 Elongierte und sphärische Nanopartikel

Wie viele andere Eigenschaften (Oberflächenfunktionalisierung, Polymerhülle, Hydrophobie) [67, 139-141] von Nanopartikeln ist auch die Form ein wichtiger Parameter für ihre Interaktionen mit Zellen, z.B. die Endozytose in HeLa-Zellen [142] und andere Zelllinien, für die Phagozytose [143] und den Medikamenten-Transport [144]. Die Form der Nanopartikel ist in den letzten Jahren als ein alternativer Parameter für das Design neuer Materialien zur Untersuchung zellspezifischer Antworten erkannt worden [40-42]. In der Natur finden sich z.B. bei den Bakterien runde Kokken und ellipsometrische Stäbchen. Zudem ist die Möglichkeit der weiteren Modifikation, wie zum Beispiel die Formgebung, vorhandener Nanopartikel mit einer abgeschlossenen Oberflächenfunktionalisierung für die Wissenschaft von großem Interesse, da auf diesem Weg mit einem geringeren Arbeitsaufwand weitere Optionen hinsichtlich der Nanopartikel-Zell-Interaktionen untersucht werden können. Zur Untersuchung der Interaktionen von nichtsphärischen Partikeln und verschiedenen Zelllinien wurden von Christine Herrmann verstreckte Polystyrolpartikel synthetisiert und die Ergebnisse publiziert [44, 145]. Zur Herstellung von verstreckten, ellipsoiden Nanopartikeln werden Polystyrolpartikel in eine hydrophile [146] oder hydrophobe [147] Polymer-Matrix eingebettet und die Matrix für die mechanische Deformation, in dieser Studie Streckung, erhitzt und im Anschluss gekühlt, so dass die deformierten Nanopartikel wieder aus der Matrix herausgelöst werden können. Die Dehnung der Filme erfolgt dabei bei einer Temperatur, die deutlich oberhalb des Glaspunktes (T_g) der Polymere liegt. Dennoch ist der Literatur bezüglich polymerer anisotroper Nanopartikel in Wechselwirkung mit Zellen wenig zu entnehmen. Für diese Studie wurden von Christine Herrmann (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz) fluoreszierende, sphärische Nanopartikel mittels radikalischer Polymerisation in Miniemulsion synthetisiert, in einem weiteren kontrollierten Schritt in einen PVA- (Polyvinylalkohol) Film

eingebettet und bei einer Temperatur von 140 °C mechanisch zu ellipsenförmigen Nanopartikeln mit unterschiedlichen Aspekt-Verhältnissen (siehe Tabelle 4) gedehnt, wobei die T_g -Werte für die Polystyrolpartikel und PVA bei 85 °C (aufgrund der Zugabe von Hexadekan im Vergleich zu Polystyrol (chem. T_g 100°C) reduziert) beziehungsweise 60 °C lagen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Eingesetzter Initiator war für alle Partikel V59. Die Partikel wurden von Christine Herrmann synthetisiert.

Bezeichnung	Monomer	Comonomer	Tensid	Durchmesser [nm]		Aspekt Verhältnis	Dehnung [%]	Zeta- Potential [mV]
NP ₂	Styrol	SSNa	SDS	100 ± 15		1	0	-54
				Polare Achse [nm]	Äquatoriale Achse [nm]			
NP ₂ + T+S ₅₀	Styrol	SSNa	SDS	191 ± 23	84 ± 9	2.30 ± 0.36	50	-
NP ₂ + T+S ₁₀₀	Styrol	SSNa	SDS	279 ± 30	70 ± 8	4.01 ± 0.56	100	-
NP ₂ + T+S ₁₅₀	Styrol	SSNa	SDS	381 ± 47	65 ± 7	5.92 ± 0.93	150	-

Mit dem Aspekt-Verhältnis wird das Verhältnis zwischen Länge und Breite des Objektes beschrieben. Ein Teil der Partikel wurde als Referenz unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Streckung, hergestellt. Diese Referenz-Partikel wurden ihrerseits in zwei Portionen aufgeteilt. Der einen Portion wurde Natriumstyrolsulfonat (SSNa) zugegeben, die andere Portion dagegen in ihrem Zustand belassen. Während der Herstellung der verstreckten Partikeln konnte teilweise SSNa nicht vollständig einpolymerisiert werden und lag als freies wasserlösliches SSNa in der Dispersion vor. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob SSNa einen direkten Einfluss auf die Aufnahmeeffizienz der verstreckten Partikel in die Zelllinien und deren Zytotoxizität hat. Die Schritte vom Ursprungspartikel NP_2 bis zu den sphärischen und nicht-sphärischen Endprodukten lassen sich mit Hilfe von Abbildung 32 nachvollziehen.

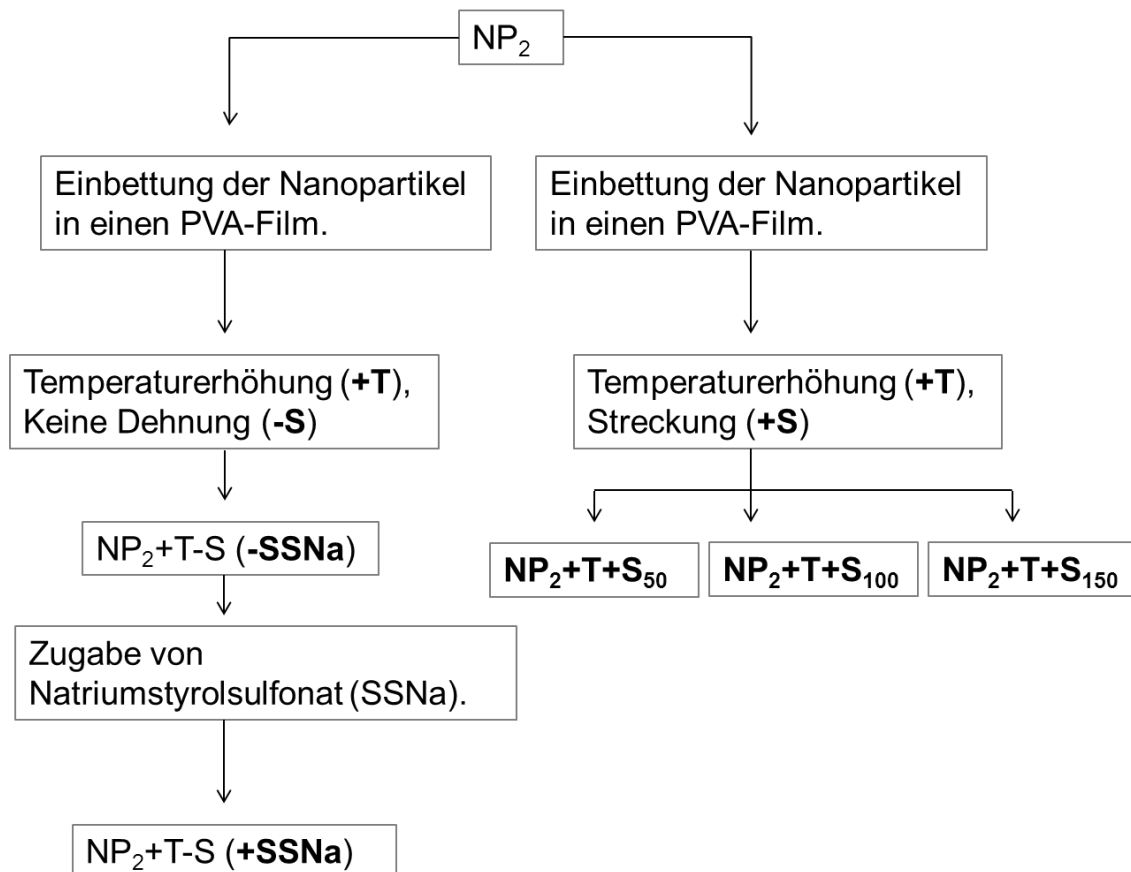


Abbildung 32: Darstellung der Herstellung anisotroper Nanopartikel bzw. der Modifizierung des Partikels NP_2 . S_{50} : Dehnung der Nanopartikel um 50%; S_{100} : Dehnung der Nanopartikel um 100%; S_{150} : Dehnung der Nanopartikel um 150%. Die Synthese erfolgte durch Christine Herrmann. Fettgedruckt sind die Bezeichnungen der für die Studie verwendeten Partikel.

Die drei nichtsphärischen für diese Studie eingesetzten und nach einer Streckung der Filme um 50, 100 und 150% erreichten Nanopartikelformen sind in Abbildung 33 dargestellt.

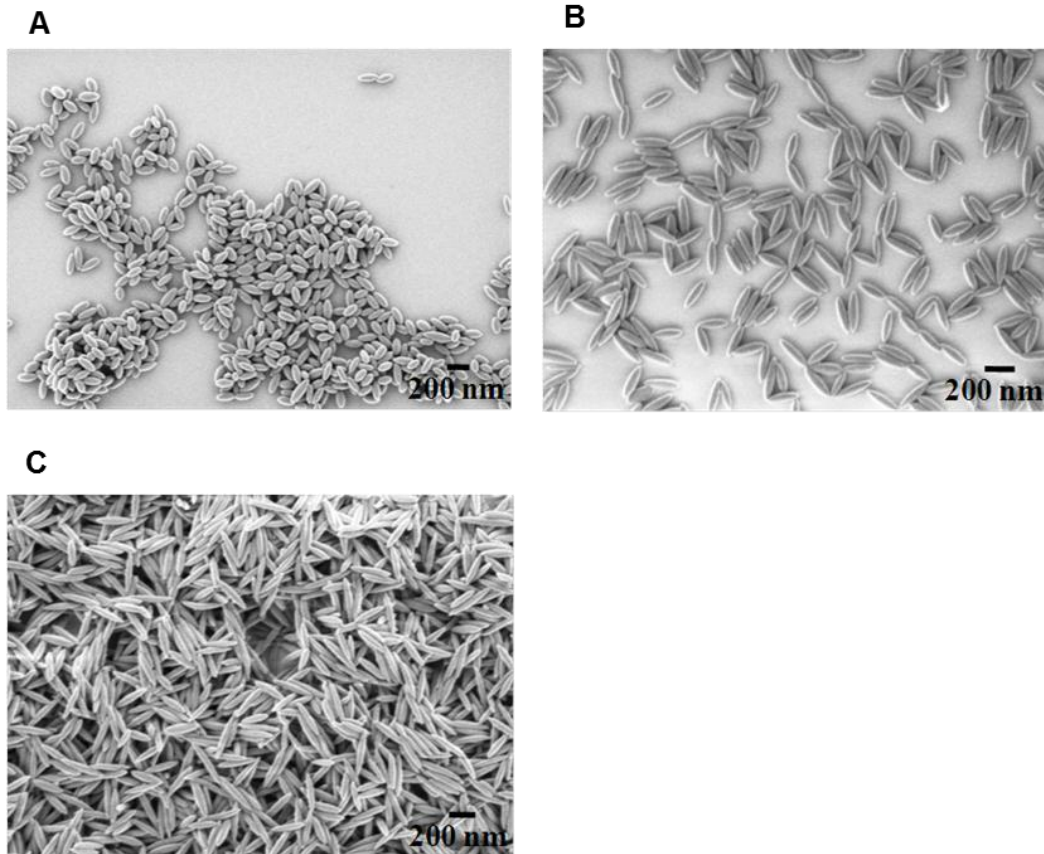


Abbildung 33: REM-Bilder der verstreckten Polystyrol-Partikel. A: NP_2+T+S_{50} ; B: NP_2+T+S_{100} ; C: NP_2+T+S_{150} . Die Bilder wurden von Christine Herrmann angefertigt.

Das Aufnahmeverhalten von sphärischen und nicht-sphärischen Nanopartikeln wurde im Folgenden quantitativ und qualitativ mit Hilfe von Durchflusszytometrie- und konfokalen Laser-Scanning-Studien untersucht.

5.3.1.1 Einfluss der Zugabe von SSNa auf die Partikelaufnahme und Toxizität

Zu Beginn dieser Studie ergab sich die Fragestellung, ob die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel mit Sulfonat-Gruppen einen so starken Einfluss auf die Aufnahme der Nanopartikel in HeLa-Zellen und hMSCs hat, dass der Einfluss der Partikelform nicht mehr effektiv zu erkennen ist. Ausschlaggebend für diese Überlegung war der Umstand, dass die Einbettung der Partikel in die PVA-Matrix sowie die Aufreinigung zu Unterschieden zwischen den Partikeln NP₂+T-S und NP₂ führen, welche wiederum die Zellaufnahme beeinflussen können. Ein Unterschied zwischen NP₂+T-S und NP₂ ist beispielsweise die Menge an SSNa, da SSNa bei der Herstellung von NP₂ nicht vollständig einpolymerisiert wird. Da die Dispersion vor der Einbettung der Partikel in die PVA-Matrix nicht aufgereinigt wurde, gibt es in dieser Dispersion noch freies wasserlösliches SSNa. Die Aufreinigung der in einem weiteren Schritt hergestellten NP₂+T-S beinhaltet hingegen mehrere Zentrifugationen und Redispergierungen in einer Isopropanol/Wasser-Mischung, bei der SSNa entfernt wird. Diese Umstände führen zu unterschiedlichen SSNa-Konzentrationen bei den Partikeln NP₂ und NP₂+T-S. Zudem war die Toxizität dieser Partikel für HeLa-Zellen und hMSCs nicht bekannt. Im ersten Schritt wurden sphärische NP₂+T-S-Partikel mit (+SSNa) und ohne (-SSNa) Oberflächenfunktionalisierungen mit Sulfonat-Gruppen hergestellt. Der Partikel NP₂+T-S ohne Zusatz von SSNa (-SSNa) wurde als Referenzpartikel verwendet. Analysen mittels Durchflusszytometrie ergaben keine Toxizität für die eingesetzten Nanopartikel NP₂+T-S sowohl für die HeLa-Zellen (siehe Abbildung 34 B) als auch für die mesenchymalen Stammzellen (siehe Abbildung 34 D). Bezüglich der Aufnahme der Nanopartikel konnte für beide Zelllinien (siehe Abbildung 34 A und Abbildung 34 C) nach der Zugabe von SSNa im Vergleich zu dem Referenzpartikel kein signifikanter Einfluss verzeichnet werden.

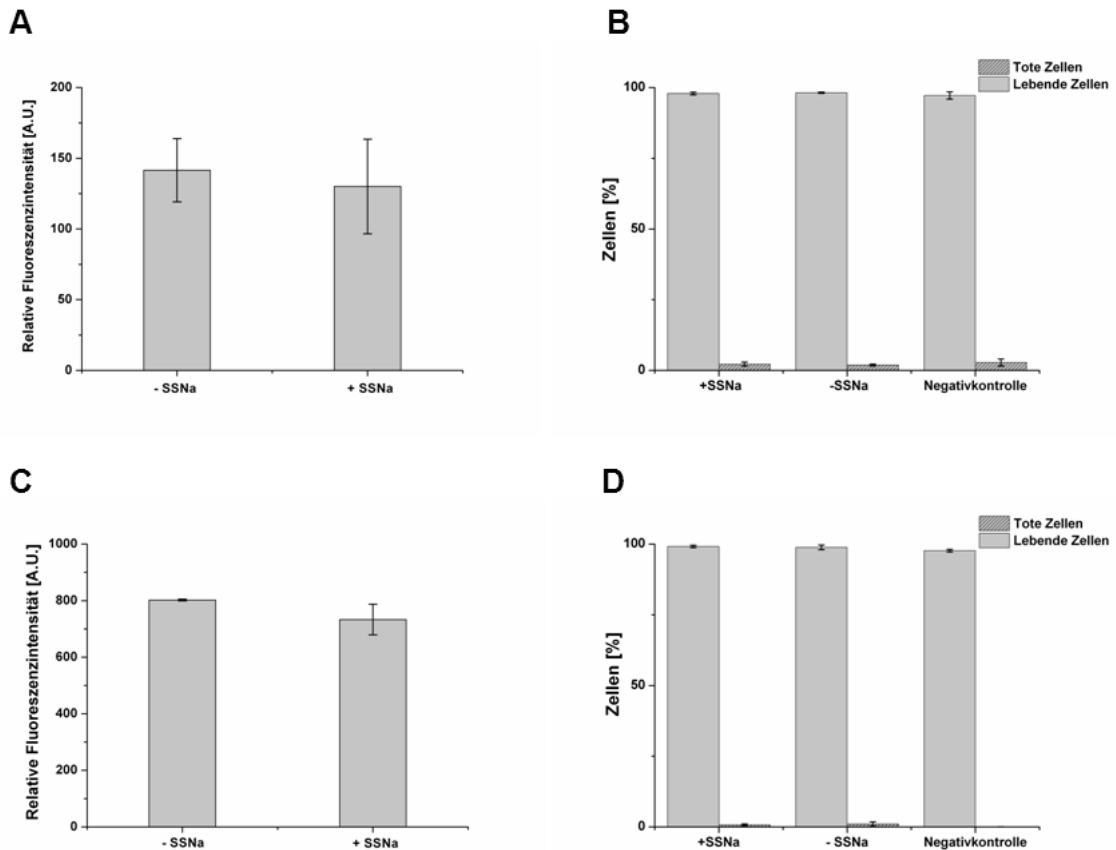


Abbildung 34: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von den unverstreckten, wärmebehandelten Nanopartikeln NP₂+T-S mit (+ SSNa) und ohne (- SSNa) Natriumstyrolsulfonat in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von 75 µg·ml⁻¹.

5.3.1.2 Einfluss der Nanopartikelform auf die Partikelaufnahme und Toxizität

Nachdem in einem weiteren Schritt die Nanopartikel NP₂ mit Sulfonat-Gruppen auf der Oberfläche um 50% (NP₂ + T+S₅₀), 100% (NP₂ + T+S₁₀₀) und 150% (NP₂ + T+S₁₅₀) mechanisch verstreckt wurden, konnte nach einer Analyse der Aufnahme dieser Partikel in HeLa-Zellen und hMSCs mittels Durchflusszytometrie ein deutlicher Einfluss der Form beziehungsweise des Aspekt-Verhältnisses beobachtet werden. Mit zunehmendem Anstieg des Aspekt-Verhältnisses nimmt die Aufnahme der nicht-sphärischen Nanopartikel in HeLa-Zellen (siehe Abbildung 35 A) und hMSCs (siehe Abbildung 35 C) kontinuierlich ab. Insgesamt werden

die nichtsphärischen Nanopartikel intensiver von den mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu den HeLa-Zellen aufgenommen. Ein signifikanter toxischer Einfluss der nichtsphärischen Nanopartikel konnte sowohl für die HeLa-Zellen (siehe Abbildung 35 B) als auch für die hMSCs (siehe Abbildung 35 D) nicht beobachtet werden.

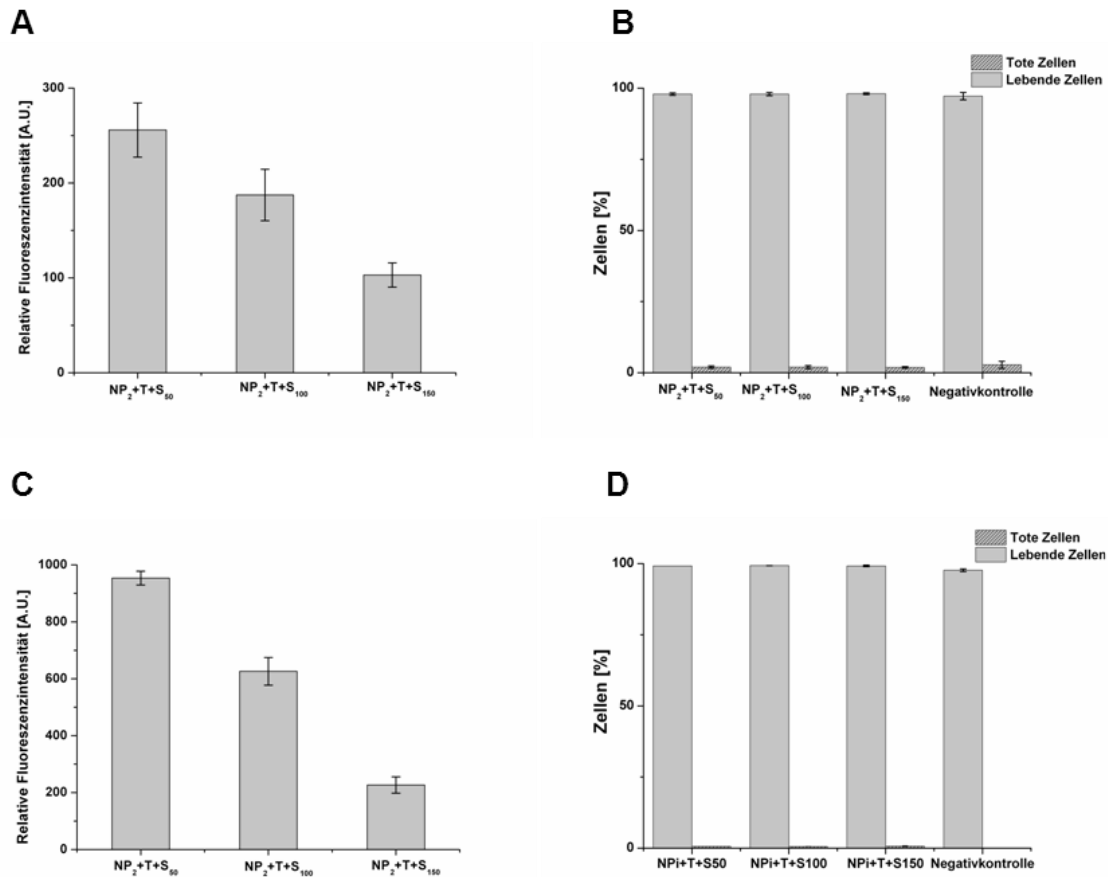
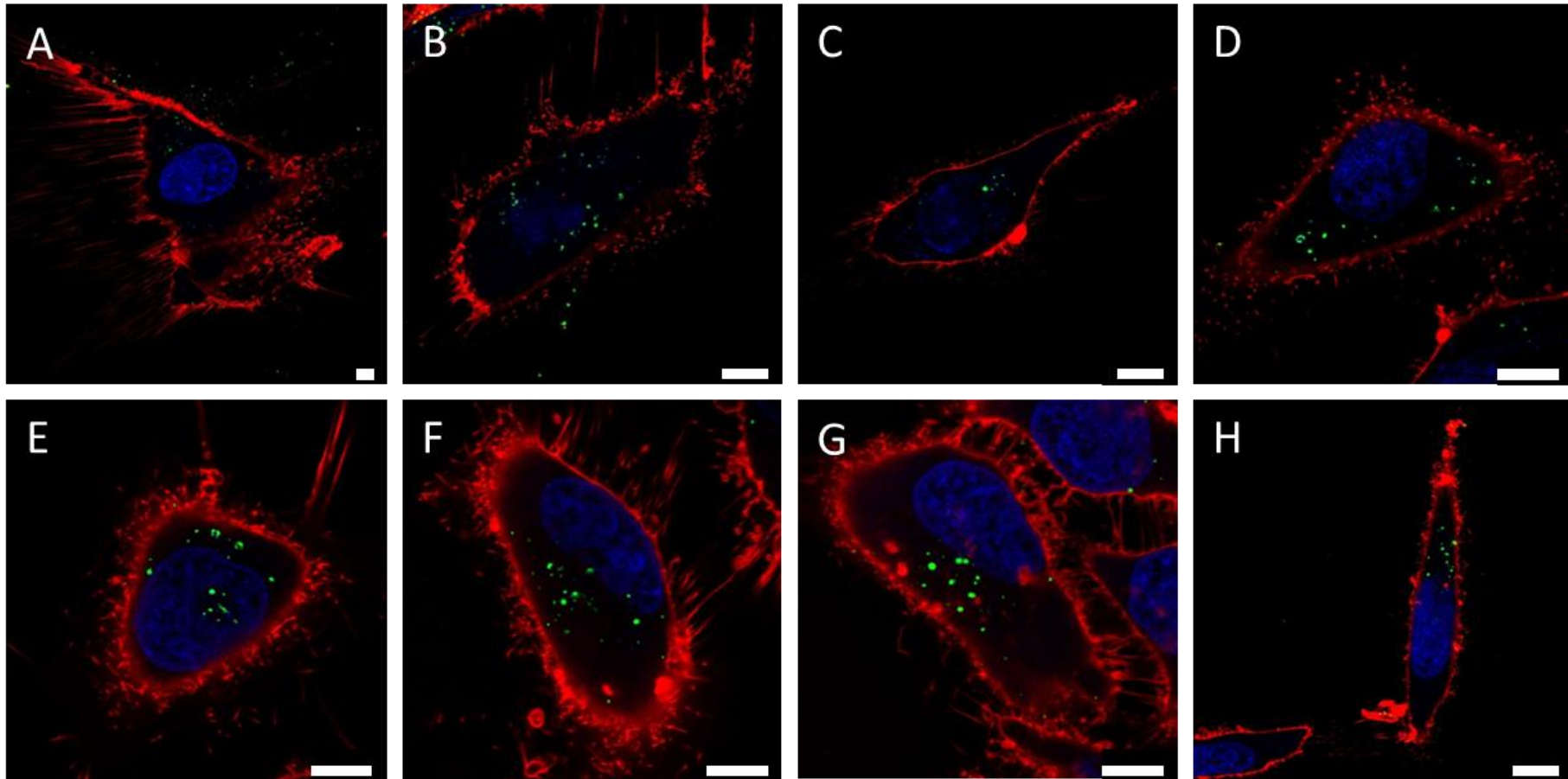


Abbildung 35: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von unterschiedlich verstreckten Nanopartikeln (50%, 100%, 150%) in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.3.1.3 Partikel-Aufnahmen im cLSM

Zur Verifizierung der Durchflusszytometrie-Studien und zur Lokalisierung der mit den Zellen interagierenden Nanopartikel wurden Analysen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie herangezogen. Zudem sollen für quantitative Aufnahme-Analysen eine Aggregation der Partikel und eine starke Anhaftung dieser an die äußere Zellmembran ohne eine anschließende Aufnahme ins Zellinnere vermieden werden. Den aufgenommenen Bildern (siehe Abbildung 36) ist zu entnehmen, dass die Aufnahme der sphärischen und nichtsphärischen Nanopartikel ins Zytoplasma der Zellen in die Nähe des Zellkerns erfolgt. Auf den Zelloberflächen konnten keine anhaftenden Nanopartikel festgestellt werden.

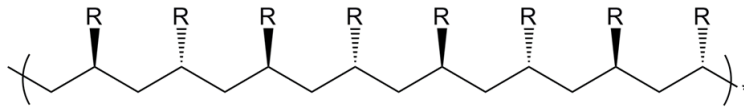


Die erzielten Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Untersuchungen, bei denen zwar andere Polymere verwendet wurden, jedoch auch auf die Form der Partikel geachtet wurde und sphärische Partikel eine bessere Aufnahme in die Zellen zeigen als nicht-sphärische Partikel [142, 148, 149]. Zusätzlich konnten *Meng et al.* zeigen, dass die Makropinozytose eine große Rolle bei der Aufnahme der Partikel spielt [149]. In der vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass die Steigerung der Partikelaufnahme in die Zellen im Kontext zur Abnahme des Aspekt-Verhältnisses unabhängig von der Art der Zelllinie erfolgt. Allein vom Verhältnis zwischen Länge und Breite der Partikel ausgehend lässt sich dieser Trend nicht erklären. Die bessere Aufnahme von sphärischen Nanopartikel in Zellen im Vergleich zur Aufnahme nicht-sphärischer Nanopartikel lässt hingegen die Vermutung zu, dass die Zellen während des Aufnahmeprozesses die Partikel vollständig umhüllen müssen und dieser Vorgang bei langgestreckten Partikeln erschwert ist. Im Umkehrschluss zeigt diese Tatsache, dass die Oberfläche der Pole von den Partikeln von großer Wichtigkeit ist, insbesondere bei deformierten Partikeln. Hinzu kommt, dass die Verteilung der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche sich nach der mechanischen Streckung wahrscheinlich verändert. Angesichts dieses Umstandes kann auch die weniger homogene Verteilung der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche die Aufnahme in die Zelle beeinflussen. Der Einfluss der Größe der Partikel auf die Makropinozytose, die Clathrin- und Caveolin-abhängige Endozytose ist von *Rejman et al.* hervorgehoben worden. Die Vesikel unterliegen einem Größenlimit [150]. Die Form der Partikel hat somit neben der Chemie einen beträchtlichen Einfluss auf die Zellaufnahme. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Studie von *Möller et al.*, in der gezeigt wurde, dass Makrophagen ellipsoide *Escherichia coli*-Bakterien immer vom Pol her aufnehmen [151]. Vermutlich ist derselbe Aufnahme-Effekt bei den HeLa-Zellen und hMSCs vorhanden.

5.3.2 Kristalline Nanopartikel

Tenside, Co-Monomere und deren Einfluss auf die Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs wurden in den vorausgegangenen Kapiteln behandelt. Weitere mögliche Kriterien für die Partikelaufnahme in verschiedene Zelllinien sind auch die Form und die Taktizität des verwendeten Polymers, in diesem Fall Polystyrol (siehe Abbildung 37). Dabei ging der Studie die Überlegung voraus, dass in der Natur bei lebenden Organismen häufig anisotrope oder kantige Formen vorzufinden sind. Diese Tatsache inspirierte die Wissenschaft dazu, anisotropes Nanomaterial, für diese Studie kristalline Nanopartikel aus syndiotaktischem Polystyrol, herzustellen [45]. Für Vergleichsstudien war isotropes Material notwendig und wurde für diese Studie mit Nanopartikeln aus ataktischem Polystyrol durchgeführt. Der Literatur sind nur sehr wenige Informationen bezüglich der Aufnahme von kristallinen Polystyrolpartikeln in verschiedene Zelllinien zu entnehmen. Dagegen ist die gute Aufnahme von anorganischen Hydroxylapatit-Partikel, die über eine kristalline Oberfläche verfügen und im biomedizinischen Bereich vor allem für orthopädische Applikationen eingesetzt werden, in Osteoblasten bekannt [1]. Über die Osteoblasten ist zudem bekannt, dass ihre Partikelaufnahme stark von der Oberflächen-Chemie, -Energie und -Topografie der eingesetzten Partikel beeinflusst wird [152-158]. Aus diesem Grund wurden für diese Studie auch die Osteoblasten-Linie SaOs-2 eingesetzt und deren Zusammenwirken mit den kristallinen Polystyrol-Partikeln untersucht.

Syndiotaktisches Polystyrol (sPS; kristallin)



Ataktisches Polystyrol (aPS; amorph)

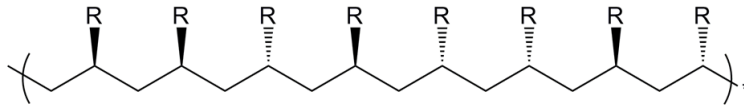


Abbildung 37: Zwei Darstellungen der möglichen Taktizitäten von Polystyrol. Beim ataktischen Polystyrol zeigen die Reste eine willkürliche Anordnung, beim syndiotaktischen Polystyrol sind sie dagegen gleichmäßig abwechselnd ausgerichtet.

Für die nachfolgend dargestellten Studien wurden amorphe Polystyrolpartikel aus ataktischem Polystyrol (aPS) und kristalline Polystyrol-Partikel aus syndiotaktischem Polystyrol (sPS) verwendet und deren Aufnahme und Zytotoxizität in HeLa-Zellen, hMSCs und Osteoblasten SaOs-2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht und anschließend mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie verifiziert. Ein Teil der Partikel (RS204, RS205) wurde über die Lösemittelverdampfungs-Technik hergestellt. Nach der Bildung der Nanopartikeln wurde dabei das Chloroform bei 40 °C verdampft und auf diesem Weg die Partikel isoliert. Bei einem anderen Teil der Probe wurde die Lösung ruhen gelassen, bis die Phasenbildung abgeschlossen ist und sich die Chloroform-Lösung und die wässrige Phase wieder deutlich voneinander unterscheiden lassen. Anschließend wurden Partikeln aus der wässrigen Phase getrennt (RS200, RS201) [45]. Die Eigenschaften der eingesetzten, von (...) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz) synthetisierten Nanopartikel sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die synthetisierten Partikel zeigen eine weitgehend homogene Größenverteilung und eine gleichmäßig sphärische Form (siehe Abbildung 38).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten kristallinen und nicht-kristallinen Polystyrol-Nanopartikel. Eingesetzter Initiator war für alle Partikel V59 und das Tensid SDS (Synthese der Partikel von (...)) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz). Das ermittelte Zeta-Potential lag im Bereich von -20 bis -40mV. sPS: syndiotaktisches Polystyrol; aPS: ataktisches Polystyrol. RS200 und RS201 wurden nach der Miniemulsion der wässrigen Phase entnommen; bei der Herstellung von RS204 und RS205 wurde Chloroform verdampft.

Bezeichnung	Monomer	Tensid	Kristallinität [%]	Zeta Potential [mV]	Größe [nm]	Taktizität	Herstellung
RS200	Styrol	SDS	60	-20 - -40	136	sPS	Phasen-Separation
RS201	Styrol	SDS	0	-20 - -40	143	aPS	Phasen-Separation
RS204	Styrol	SDS	60	-20 - -40	134	sPS	Lösemittel-verdampfungs-Technik
RS205	Styrol	SDS	0	-20 - -40	137	aPS	Lösemittel-verdampfungs-Technik

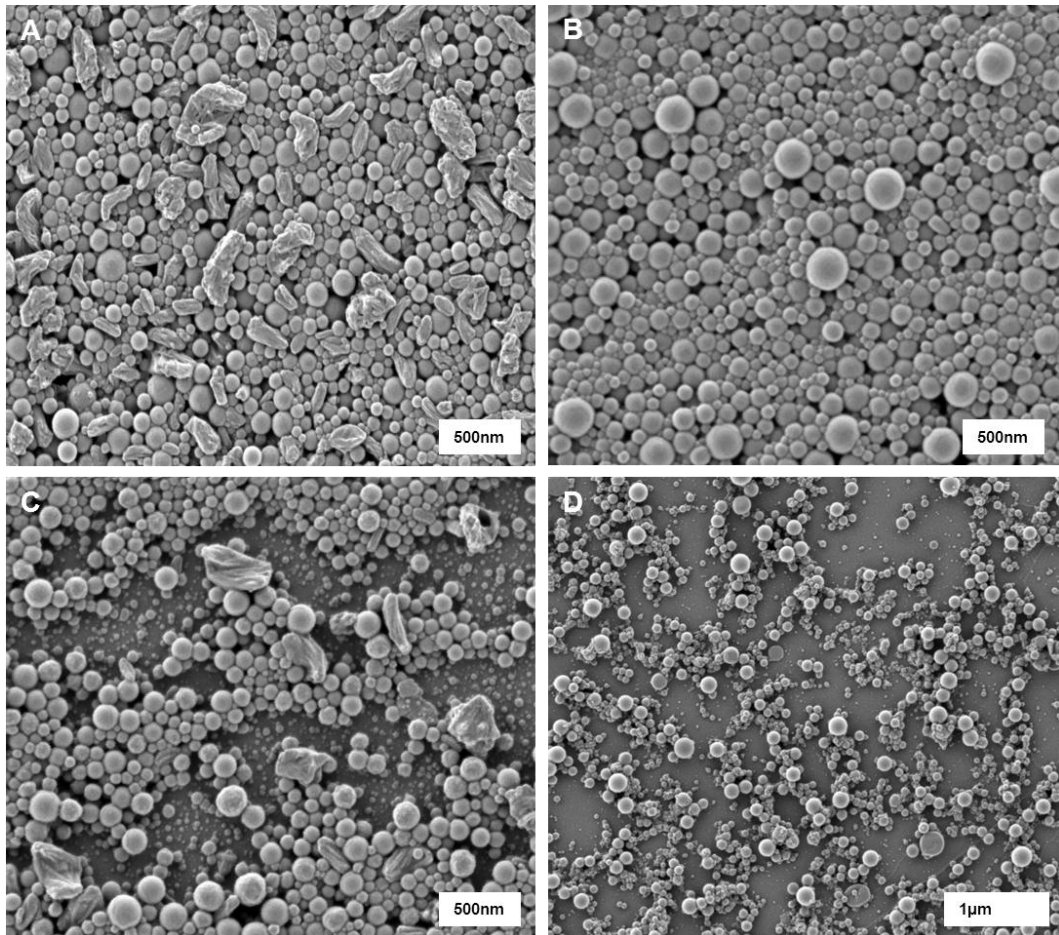


Abbildung 38: TEM-Aufnahmen der verwendeten Partikel. A: RS200 (sPS); B: RS201 (aPS); C: RS204 (sPS); D: RS205 (aPS). RS200 und RS201 wurden mittels Phasen-Separation und RS204 und RS205 mittels Lösemittelverdampfungs-Technik hergestellt. Die Bilder wurden von Roland Staff erstellt.

Petersen et al. zeigten bei Studien mit kristallinen Lipid-Partikeln und Fibroblasten, dass die Oberfläche der Partikel einen großen Einfluss auf die Zytotoxizität und Aufnahme der Partikel in die Zellen ausübt [43]. Je eckiger beziehungsweise verwinkelter die Partikel sind, desto stärker ist die Aufnahme in die Zellen. Allerdings steigt laut *Petersen et al.* auch die Toxizität der Partikel mit zunehmender Kristallinität für die Fibroblasten [43]. Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Aufnahme von kristallinen Polystyrol-Partikel in verschiedene Zelllinien (HeLa-Zellen, hMSCs, Osteoblasten SaOs-2) hinsichtlich des Einflusses der Kristallinität. Weiterhin wurde parallel untersucht, ob die

Taktizität des eingesetzten Polystyrols und ob die Herstellungsmethode während der Miniemulsion einen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel in die Zelllinien und deren Zytotoxizität hat.

5.3.2.1 Partikelaufnahme und Toxizität im FACS

Die Aufnahme der kristallinen Polystyrol-Partikel und deren Zytotoxizität wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach einer vorausgegangenen Färbung der Zellen mit 7-AAD untersucht. Die Zellen wurden 20 h mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ an Partikeln inkubiert. Die kristallinen Polystyrol-Partikel zeigen insgesamt eine gute Aufnahme in den verschiedenen Zelllinien. Abbildung 39 A ist zu entnehmen, dass zum einen die syndiotaktischen, kristallinen Polystyrol-Partikel besser aufgenommen werden als die ataktischen Polystyrol-Partikel. Weiterhin zeigen die Polystyrol-Partikel, die nach der Herstellung mittels Miniemulsion der wässrigen Phase entnommen wurden (Phasenseparation; RS200, RS201), eine stärkere Aufnahme in die HeLa-Zellen als die Partikel, die nach der Verdampfung des Chloroforms während des Herstellungsprozesses verfügbar waren (RS204, RS205). Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle konnte keine signifikante Zytotoxizität festgestellt werden (siehe Abbildung 39 B).

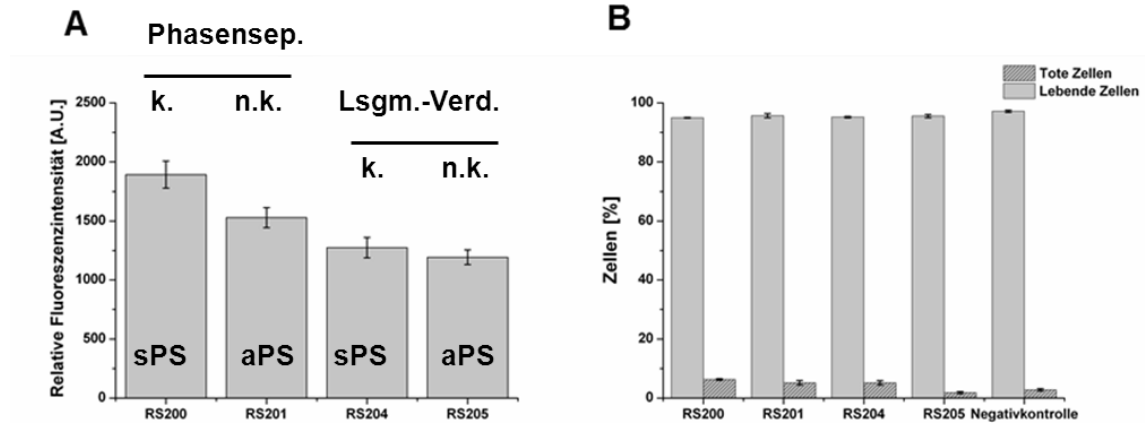


Abbildung 39: Aufnahme (A) und Viabilität (B) von nicht-/kristallinen PS-Partikeln in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. sPS = syndiotaktisches PS; aPS = ataktisches PS; k. = kristallin; n.k. = nicht kristallin. RS200 und RS201 wurden mittels Phasenseparation, RS204 und RS205 mittels Lösemittelverdampfungs-Technik hergestellt.

Für die humanen hMSCs (siehe Abbildung 40 A) und den Osteoblasten SaOs-2 (siehe Abbildung 40 C) konnten in einem leicht geringeren Ausmaß das gleiche Aufnahmeverhalten wie bei den HeLa-Zellen (siehe Abbildung 39 A) beobachtet werden. Eine Zytotoxizität konnte für beide Zelllinien nicht ausgemacht werden (siehe Abbildungen 40 B und D).

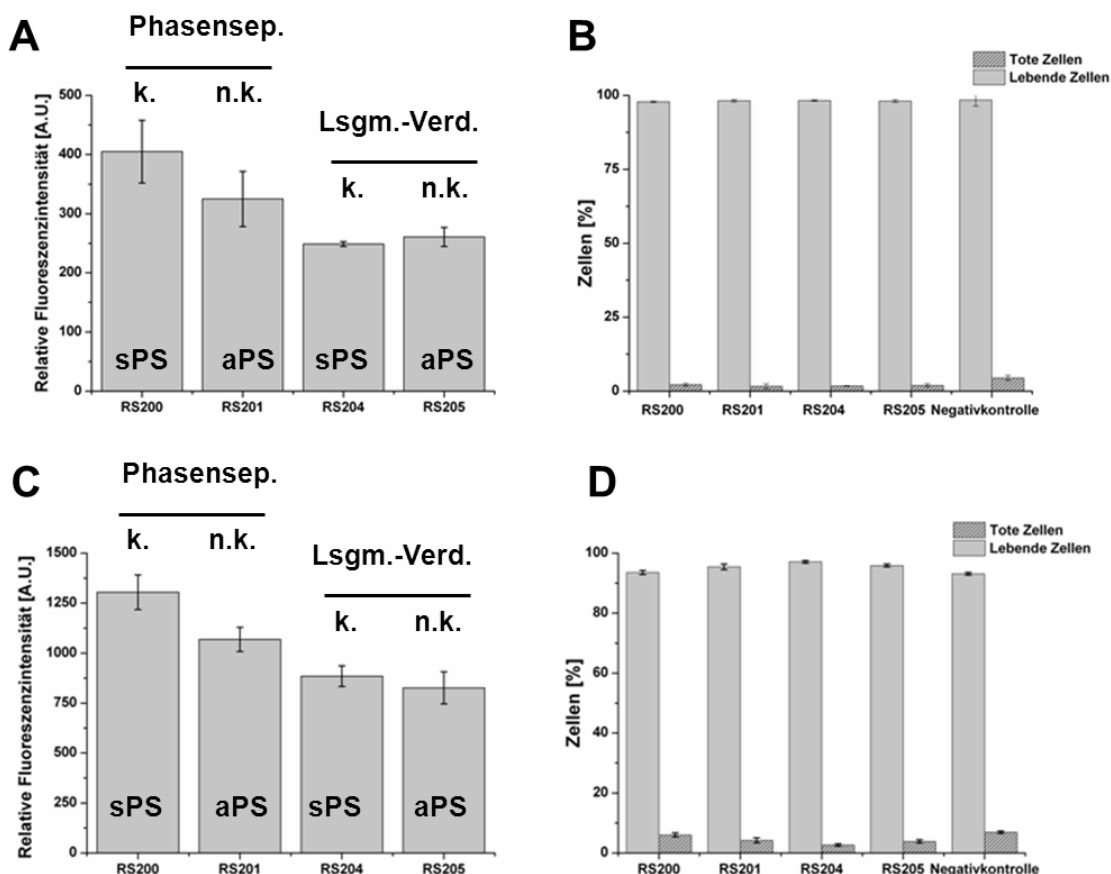


Abbildung 40: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von kristallinen PS-Partikeln in hMSCs (A, B) und SaOs-2-Zellen (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. sPS = syndiotaktisches PS; aPS = ataktisches PS; k. = kristallin; n.k. = nicht kristallin. RS200 und RS201 wurden mittels Phasenseparation, RS204 und RS205 mittels Lösemittelverdampfungs-Technik hergestellt.

5.3.2.2 Partikelaufnahme im cLSM

Zur Verifizierung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt konfokale Laser-Raster-Mikroskopie-Bilder von den drei eingesetzten Zelllinien und den verschiedenen kristallinen Polystyrol-Partikeln erstellt. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls 20 h mit kristallinen Polystyrol-Partikeln mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert (siehe Abbildung 41).

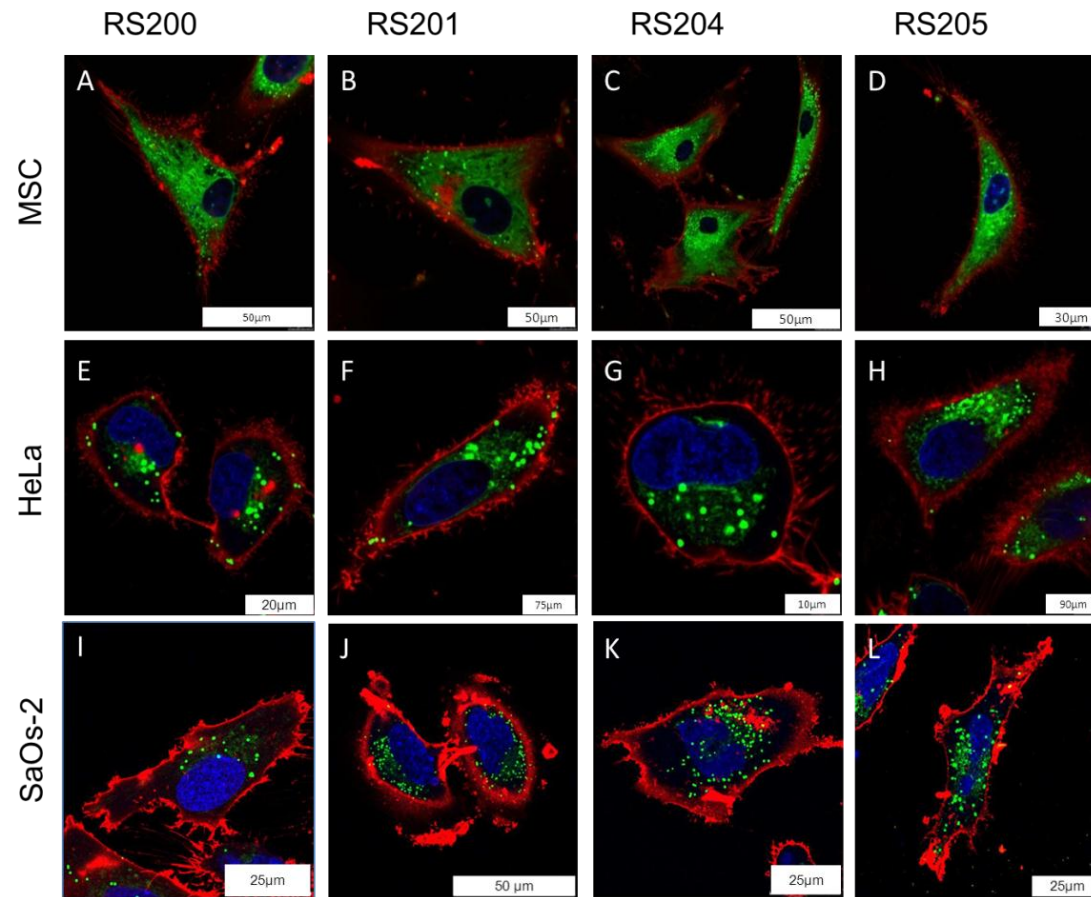


Abbildung 41: Aufnahme von kristallinen Polystyrol-Partikel in hMSC- (A – D), HeLa- (E - H) und SaOs-2- (I – L) Zellen nach 20 Stunden Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Partikel (PMI) erscheinen grün, die Zellmembran rot (CellMaskOrange) und der Zellkern blau (DraQ5). A, E, I: RS200; B, F, J: RS201; C, G, K: RS204; D, H, L: RS205.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 41 zeigen, dass die kristallinen Polystyrol-Partikel eine gute Aufnahme in die verschiedene Zelllinien zeigen. Auf den Bildern sind keine auf der Zelloberfläche anhaftenden Partikel zu erkennen. Interessanterweise zeigt die den in den Partikeln vorhandenen Farbstoff PMI signalisierende grüne Fluoreszenz insbesondere innerhalb der humanen Mesenchymalen Stammzellen eine diffuse Präsenz im Zytosol (siehe Abbildung 41 A-D), was die Vermutung zulässt, dass die Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffs schon nach 20 h eingetreten ist.

Insgesamt lässt sich nach dieser Studie resümieren, dass die Form und Oberflächenbeschaffenheit der eingesetzten Nanopartikel keinen auffälligen Einfluss auf die Aufnahmekinetik für Zellen und die Zytotoxizität hat. Die Aufnahmeeffizienz ist bei allen eingesetzten Nanopartikeln gut ohne auffällige Unterschiede. Damit wird mit Hilfe dieser Studie die Studie von *Petersen et al.* insofern bekräftigt, dass eckige Nanopartikel von den HeLa-Zellen und hMSCs gut aufgenommen werden [43]. Jedoch konnten keine signifikante Verbesserung der Aufnahme gegenüber nicht-kristallinen Partikeln verzeichnet werden.

5.4 Nanosysteme mit reduzierter zelluläre Aufnahme

5.4.1 PEGylierung von Polystyrolpartikel, Modifizierung mit verschiedenen Tensiden und der Einfluss auf die zelluläre Aufnahme

Die Etablierung von unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln in der Nanomedizin, zum Beispiel für einen zielgerichteten Medikamententransport, stellt ein sehr breites Untersuchungsfeld dar. In diesem Zusammenhang zeigte sich schnell das Problem, dass die Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) rasch eingreifen und die Partikeln aus dem Blutstrom eliminieren [159, 160]. Dabei gilt es, das Problem der Eliminierung der Nanopartikeln aus dem Blutkreislauf zu umgehen, bevor die Nanopartikel in das Zielgewebe, beispielsweise Tumorgewebe, gelangen können. Alle Partikel, die in ein biologisches System gelangen, kommen unmittelbar in Kontakt mit einer Vielzahl von Proteinen [98], und im Blutkreislauf werden Nanopartikel mit Protein-Coronas sehr schnell durch die Phagozytose der Makrophagen entfernt, bevor sie das pathogene Gewebe erreichen [119, 161]. Als besonders hilfreich erwies sich hierbei die Erkenntnis, dass die Phagozytose mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die adsorbierten Proteine vorangetrieben wird [162-164]. Somit ist es ein grundsätzliches Ziel, die unspezifische Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche zu reduzieren. Dieser Prozess lässt sich mit der Modifizierung von Partikeln mit hydrophilen Molekülen auf der Partikeloberfläche umgehen. Die Zellerkennung und darauffolgende Phagozytose ist ausgeprägter bei hydrophoben Oberflächen [165-167]. Die stark hydrophilen Polyethylenglykol-Ketten auf den Oberflächen der für diese Studie verwendeten PEGylierten Partikel bilden eine Barriere gegen die Proteine im umgebenden Medium, indem die Ausbildung einer Protein-Corona minimiert wird. Eine Möglichkeit hierzu bietet der Einsatz von Polyethylenglykol (PEG) zur Oberflächenmodifizierung der Nanopartikel. In einer radikalischen Polymerisation können PEG-Ketten über Polyethylenglykol-Methacrylat (PEG-MA) als Comonomer eingebracht werden. Eine andere Möglichkeit bietet der Einsatz kurzkettiger Polyethylenglykole über die Stabilisierung der Partikel mit dem Tensid Lutensol AT50. Seit den ersten

Studien mit dem Einsatz von PEG in den späten achtziger Jahre gibt es zahlreiche Studien, die das Wirkungsprinzip der Oberflächenfunktionalisierung mit PEG belegen [168, 169]. Diese Eigenschaft der PEGylierten Partikeln gegenüber Proteinen und der daraus resultierenden Nicht-Erkennung durch Zellen [169-171] wurde in den letzten Jahren durch weitere Oberflächenmodifikationen aufgehoben oder spezifiziert, so dass die modifizierten Nanopartikel nur noch vom Zielgewebe erkannt und aufgenommen werden [172, 173]. Ein weiterer Vorteil für den Einsatz von PEG ist dessen geringe Zelltoxizität [107, 174]. Diese Eigenschaften von PEGylierten Partikel bieten zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin, Biotechnologie und Biophysik [167, 172-175]. Einzig die schwache Bindung von PEG an den Polystyrolpartikeln erfordert eine dichte Beschichtung der Partikel mit PEG [176]. Die Stärke der Proteinanziehung bzw. -abstoßung hängt bei dem Einsatz von PEG zur Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln auch von der jeweiligen Länge der PEG-Kette und dementsprechend vom Molekulargewicht ab [16]. Dies wurde theoretisch [177, 178] und experimentell [161, 171, 179] nachgewiesen und zahlreich publiziert [62, 180-183]. Beispielsweise konnten *Meng et al.* nachweisen, dass die Proteinadsorption von menschlichem Plasma mit abnehmendem Kettenlängen und Molekulargewicht von PEG zunimmt [184, 185]. Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung der unspezifischen Aufnahme der Partikel in Zellen könnte der Einsatz von Tensiden [186] oder die Kombination von Tensiden und unterschiedlich langen PEG-Ketten darstellen. In der nachfolgend beschriebenen Studie wurde der Frage, inwiefern verschiedene Kettenlängen von PEG die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere beeinflusst und inwieweit sich dieser Effekt mit dem Einsatz von anionischen (SDS) und nicht-ionischen PEGylierten Tensiden (Lutensol AT50) variieren lässt, nachgegangen. *Musyanovych et al.* konnten nachweisen, dass mit dem Tensid SDS stabilisierte Partikel eine gute Aufnahme, mit dem Tensid Lutensol AT50 stabilisierte Partikel dagegen eine verminderte Aufnahme in HeLa-Zellen zeigen [186]. Abbildung 42 zeigt schematisch dargestellt die Stabilisierung der Partikel mit den Tensiden SDS oder Lutensol AT50 und die Oberflächenmodifikationen mit unterschiedlich

langen PEG-MA-Ketten (5 Einheiten Ethylenglykol, $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und 45 Einheiten Ethylenglykol und $2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

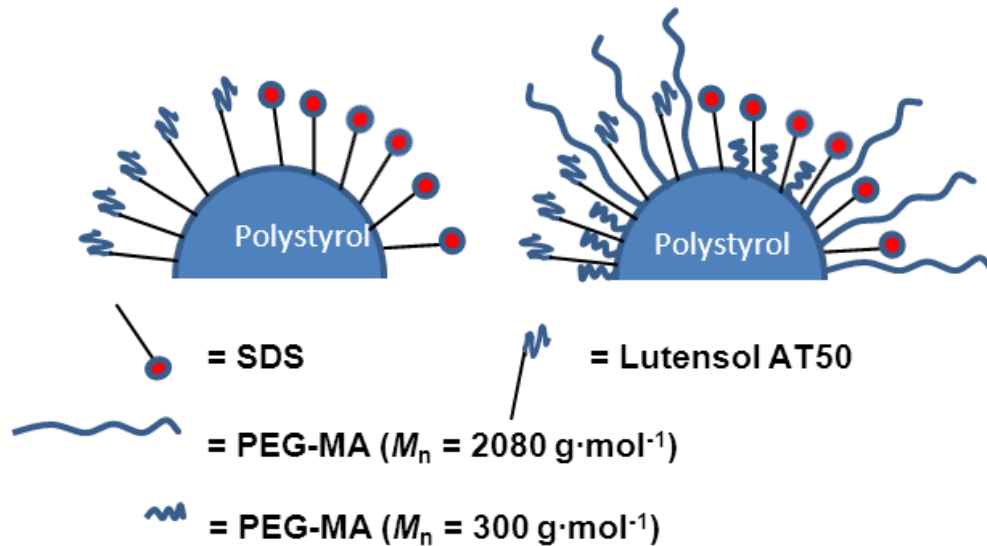


Abbildung 42: Skizze von Polystyrolpartikeln mit unterschiedlichen Kettenlängen PEG-MA (5 Einheiten Ethylenglykol, $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und 45 Einheiten Ethylenglykol und $2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und das theoretische Verhältnis zum eingesetzten Tensid (Lutensol AT50 oder SDS).

Zunächst wurde der Einfluss der mit unterschiedlich langen PEG-Ketten modifizierten Nanopartikel-Oberflächen auf die zelluläre Aufnahme untersucht. Hierzu wurden sowohl Polystyrol-Partikel mit 5 Einheiten Ethylenglykol ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) als auch Polystyrol-Partikel mit 45 Einheiten Ethylenglykol ($M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) langen PEG-Ketten hergestellt. Dabei wurden mehrere Partikel mit unterschiedlichen Prozent-Anteilen (0,08 mol %, 0,26 mol %, 0,55 mol %) des jeweiligen PEG-MA synthetisiert. Diese Partikel-Gruppen wurden jeweils erneut in 2 Gruppen aufgeteilt, jeweils eine Gruppe mit SDS und eine Gruppe mit Lutensol AT50 stabilisiert. Auf diese Art und Weise sollte überprüft werden, inwiefern der Einsatz der Tenside SDS und Lutensol AT50 die zelluläre Aufnahme beeinflusst. Unklar war zudem, ob die Tenside SDS und Lutensol AT50 die Effekte der mit unterschiedlich langen PEG-Ketten modifizierten

Partikel-Oberflächen vermindern oder verstärken. Als Referenzen wurden ein mit SDS und ein mit Lutensol AT50 stabilisierter Polystyrol-Partikel ohne PEG-MA auf der Oberfläche hergestellt. Die Eigenschaften der hierfür eingesetzten Partikel sind Tabelle 7 (siehe Kapitel 5.4.1.1) zu entnehmen. In einem darauffolgenden Experiment wurde untersucht, ob die zusätzliche Modifikation der jeweiligen Polystyrol-Partikel mit dem anderen Tensid (statt SDS Lutensol AT50 und statt Lutensol AT50 SDS) die zuvor beobachtete Wirkung umkehrt oder nicht. Die Eigenschaften der eingesetzten Partikel sind der Tabelle 8 (siehe Kapitel 5.4.1.3) zu entnehmen. Den Abschluss dieser Untersuchung bildete die Untersuchung der zelluläre Aufnahme des mit ansteigenden Konzentrationen (5%, 10%, 25%, 50%, 100%) an PEG-MA ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) modifizierten und mit SDS stabilisierten Polystyrol-Partikel (siehe Kapitel 5.4.1.4). Die Eigenschaften der hierfür eingesetzten Partikel sind ebenfalls Tabelle 7 in Kapitel 5.4.1.3 zu entnehmen.

5.4.1.1 Durchflusszytometrieanalysen zur Aufnahme von mit verschiedenen langen PEG-MA und verschiedenen Detergenzien modifizierten Polystyrol-Partikel in HeLa-Zellen und hMSCs

Die Aufnahme der in Tabelle 6 aufgelisteten, mit 2 verschiedenen langen PEG-MA ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und entweder mit SDS oder Lutensol AT50 stabilisierten Nanopartikel in HeLa-Zellen und hMSCs wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden Nanopartikel mit einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ eingesetzt und 20 h mit der jeweiligen Zelllinie bei 37°C inkubiert.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Partikel. Die Synthese der Partikel erfolgte durch Beatrix Ruppel. Alle Partikel bestehen aus dem Monomer Styrol und der eingesetzte Initiator war für alle Partikel V59, der Fluoreszenz-Farbstoff PMI. Alle Partikel wurden nach der Synthese einer Dialyse zur Entfernung des freien Tensids unterzogen.

Bezeichnung	PEG-MA-Comonomer [mol %]	Tensid	Größe [nm]	Zetapotential [mV]
BR01	-	SDS	108	-58
BR02	-	Lutensol AT50	294	-11
KG-41	-	Lutensol AT50	104	-5
BR04	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	Lutensol AT50	266	-10
BR06	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,26)	Lutensol AT50	286	-12
BR08	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	SDS	104	-55
BR10	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,26)	SDS	113	-52
BR11	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,55)	SDS	101	-54
BR13	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,55)	Lutensol AT50	286	-10
BR15	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	SDS	105	-56
BR16	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,26)	SDS	112	-52
BR18	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,55)	SDS	125	-53
BR22	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	Lutensol AT50	316	-12
BR24	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,26)	Lutensol AT50	294	-9
BR26	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,55)	Lutensol AT50	309	-10

Wie Abbildung 43 zu entnehmen ist, zeigt der unmodifizierte bzw. nicht-PEGylierte, mit SDS stabilisierte Nanopartikel BR01 die höchste Aufnahme in die HeLa-Zellen. Der in Lutensol AT50 redispersierte, ebenfalls nicht-PEGylierte Nanopartikel BR02 wird dagegen am wenigsten aufgenommen. Nachdem sich bei den Partikeln BR01 und BR02 schon ein deutlicher Einfluss des verwendeten Tensids auf die Aufnahme in Zellen zeigt, wurden bei weiteren Partikeln zwei verschiedene Formen des Co-Monomers PEG-MA eingesetzt.

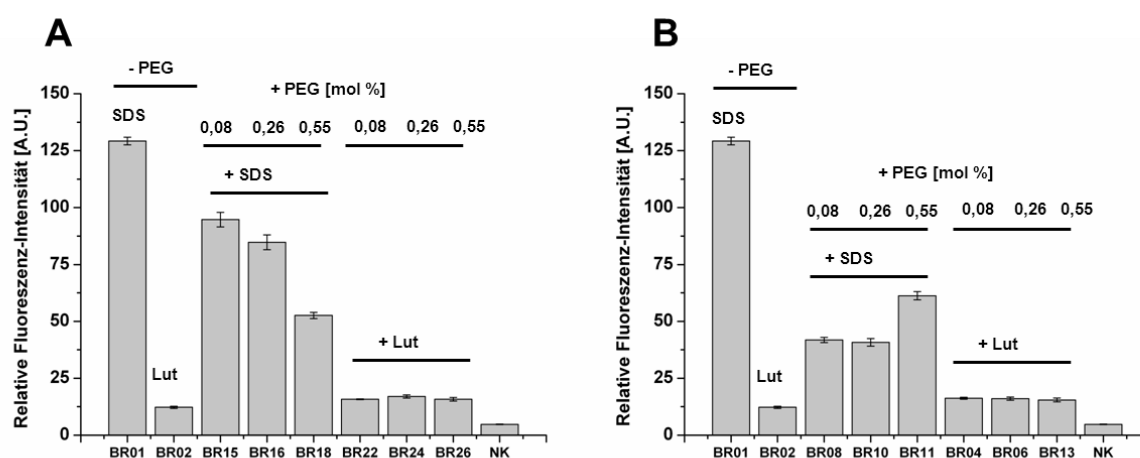


Abbildung 43: Aufnahme von PEGylierten Nanopartikeln in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. SDS und Lut (= Lutensol AT50) stehen für die eingesetzten Tenside. A: Einsatz von PEG-MA $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; B: Einsatz von PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Die beiden Comonomere PEG-MA unterscheiden sich in ihrem jeweiligen Molekulargewicht und dementsprechend in den Längen der PEG-Ketten auf der Partikeloberfläche, es wurden Molekulargewichte von $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, welches 5 Einheiten Ethylenglykol entspricht, und PEG $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 45 Einheiten Ethylenglykol entsprechend, gewählt. Zu beobachten ist, dass mit steigender Konzentration von PEG-MA $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (0,08 mol %, 0,26 mol %, 0,55 mol %) die Aufnahme der mit SDS stabilisierten Partikel konstant abnimmt. Bei PEG-

MA mit $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ zeigt sich dagegen kein erkennbarer Einfluss der verschiedenen Konzentrationen auf die Aufnahme der Partikel in die HeLa-Zellen, wobei die geringste eingesetzte Menge an PEG-MA (0,08 mol % $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) die gleiche Reduktion im Aufnahmeverhalten wie die höchste eingesetzte Konzentration des kürzerkettigen PEG-MA (0,55 mol % $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) aufweist. Auffällig ist, dass bei den in Lutensol AT50 stabilisierten Partikeln kein Einfluss von PEG-MA auf die Aufnahme zu verzeichnen ist. Die Partikel zeigen das gleiche Aufnahmeverhalten wie die nicht-PEGylierten, mit Lutensol AT50 stabilisierten Partikel BR02. Daraus folgend lässt sich die Aussage treffen, dass Lutensol AT50 die Aufnahme der Partikel in die Zelllinien stärker hemmt als der Einsatz von PEG als weitere Modifikation. Bei einem Einsatz von Lutensol AT50 zeigt der Zusatz von PEG-MA keinen erkennbaren Einfluss. Hingegen zeigt PEG einen deutlichen Einfluss bei Partikeln, die mit SDS stabilisiert wurden. Hier lassen die mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführten Analysen den Schluss zu, dass eine Zunahme der PEG-Kettenlänge zu einer steigenden Hemmung der Aufnahme der PEGylierten Partikel in verschiedene Zelllinien führt. Der fehlende Einfluss der Lutensol AT50-stabilisierten Nanopartikel könnte auch auf die Größe der Partikel zurückgeführt werden. Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, haben die mit SDS stabilisierten Polystyrol-Partikel nur ca. 50% der Größe der mit Lutensol AT50 stabilisierten Partikel. Das verwendete Detergenz beeinflusst während der Synthese die Größe der Partikel. Da die Partikelgröße einen entscheidenden Faktor bei der Aufnahme von Nanopartikeln darstellen kann [56], stellte sich die Frage, ob Lutensol AT50 die Aufnahme der Partikel in die Zellen indirekt über die Größenbildung beeinflusst. Bei den hMSCs (Abbildung 44 A und B) zeigt sich das exakt gleiche Aufnahmeverhalten der Partikel wie bei den HeLa-Zellen (Abbildung 43 A und B), jedoch in geringerem Ausmaß.

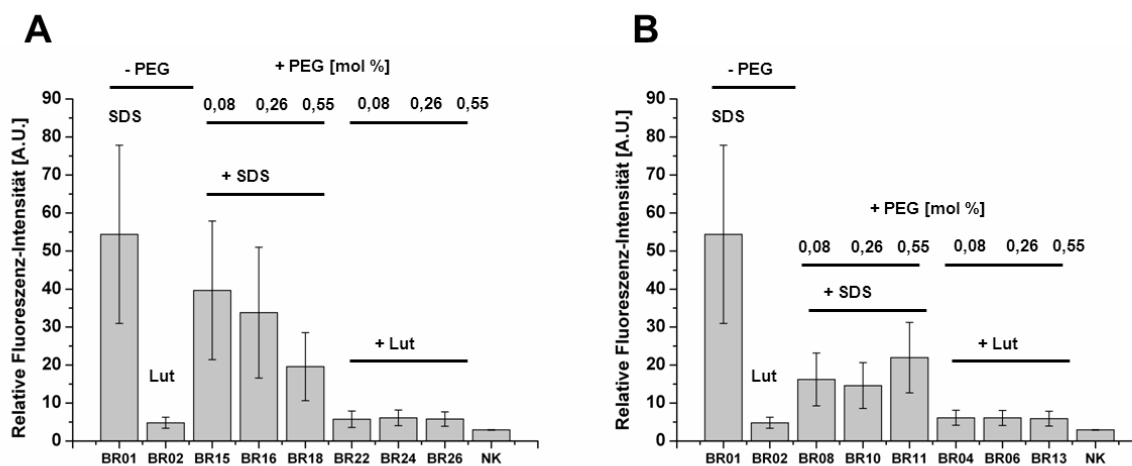


Abbildung 44: Aufnahme von PEGylierten Nanopartikeln in hMSCs nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. SDS und Lut (= Lutensol AT50) stehen für die eingesetzten Tenside. A: Einsatz von PEG-MA $M_n=300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; B: Einsatz von PEG-MA $M_n=2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Eine Zytotoxizität der PEGylierten und Kontroll-Nanopartikeln konnte sowohl für die HeLa-Zellen (Abbildung 45 A) als auch für die hMSCs (Abbildung 45 B) nach einer Färbung mit dem durch die Membran poröser, toter oder sterbender Zellen eindringenden und fluoreszierenden Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) nicht nachgewiesen werden.

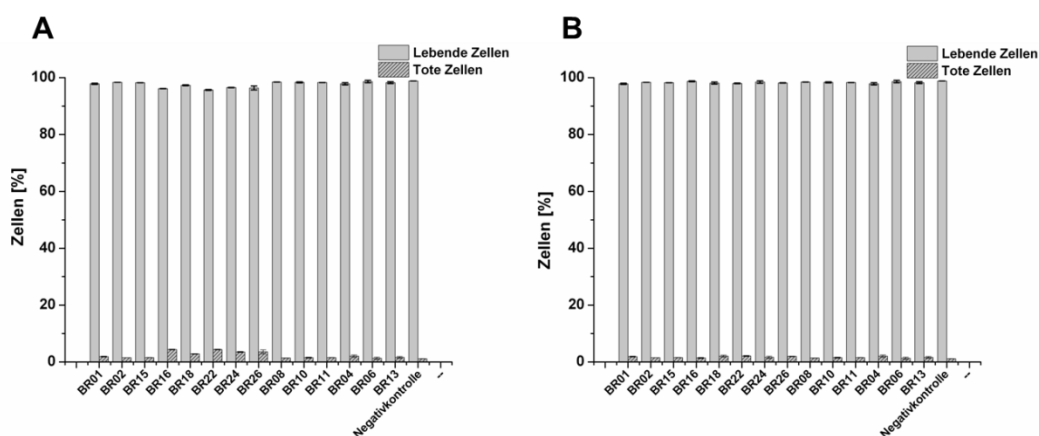


Abbildung 45: Viabilität von HeLa-Zellen (A) und hMSCs (B) nach 20 h Inkubation mit $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Nanopartikeln nach einer Färbung mit 7-AAD.

Um die Frage zu klären, ob die verminderte Aufnahme der mit Lutensol AT50 stabilisierten Nanopartikel auf die Größe der Partikel zurückzuführen ist, wurde zur Kontrolle ein weiterer mit Lutensol AT50 stabilisierter, nicht mit PEG-MA modifizierter Nanopartikel synthetisiert (KG-41) und dessen Aufnahme in HeLa-Zellen und dessen Zytotoxizität untersucht. Gemeinsam mit dem neuen Nanopartikel wurden die Partikel BR01 (SDS, ohne PEG-MA), BR04 (Lutensol AT50, 0,08 mol % PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), BR06 (Lutensol AT50, 0,26 mol % PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), BR08 (SDS, 0,08 mol % PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und BR10 (SDS, 0,08 mol % PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) getestet. Die Aufnahme der schon zuvor als Kontrolle mit SDS stabilisierten Nanopartikel BR08 und BR10 und mit Lutensol AT50 stabilisierten Nanopartikel BR04 und BR06 in HeLa-Zellen bestätigen die zuvor aufgeführten Ergebnisse (siehe Abbildung 46 A im Vergleich zu Abbildung 43). Eine Zytotoxizität konnte für sie auch diesmal nicht nachgewiesen werden. Der nur 104 nm große, mit Lutensol AT50 stabilisierte Kontrollpartikel KG-41 hingegen wird nicht von den HeLa-Zellen aufgenommen und zeigt zugleich eine leicht erhöhte Zytotoxizität (siehe Abbildung 46 B). Diese erhöhte Zytotoxizität könnte auch auf den höheren Anteil an Lutensol AT50 während des Herstellungsprozesses, der notwendig für die Einstellung einer Partikelgröße von 104 nm war, zurückzuführen sein.

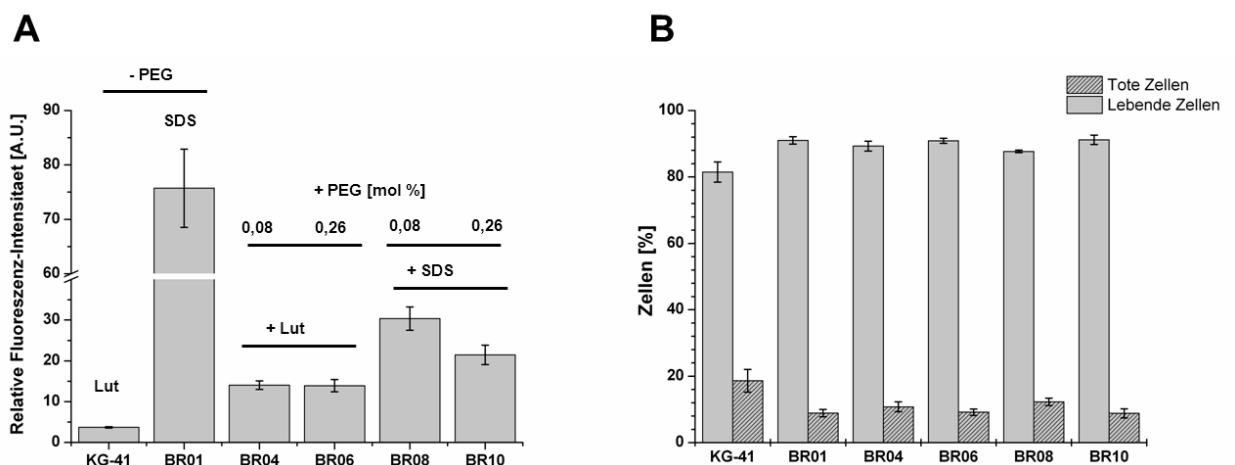


Abbildung 46: Aufnahme (A) von mit PEG-MA $M_n=2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ PEGylierten Nanopartikeln in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und die Viabilität (B) der HeLa-Zellen.

Den Ergebnissen der zuvor aufgeführten Analysen zufolge ist der die zelluläre Aufnahme reduzierende Effekt bei dem Einsatz des Tensids Lutensol AT50 größer als der Einsatz von PEG-MA. Bei den mit SDS stabilisierten Polystyrol-Partikeln ist der Einfluss von PEG-MA deutlich zu beobachten. Der Einsatz von PEG-MA mit einem Molekulargewicht von $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ reduziert die zelluläre Aufnahme stärker als der Einsatz von PEG-MA mit einem Molekulargewicht von $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bei den mit SDS stabilisierten Polystyrol-Partikeln mit steigender Konzentration an PEG-MA $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ nimmt die zelluläre Aufnahme mit der zunehmenden Konzentration an PEG-MA ab.

5.4.1.2 Aufnahmekinetik mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik wurden Messungen nach 1, 2, 4, 8, 16 und 20 h durchgeführt. Eingesetzt wurde eine Auswahl der zuvor verwendeten Partikel mit einem jeweiligen Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ausgewählt wurden die Referenz-Partikeln (BR01 und BR02) und die mit der höchsten Konzentration (0,55 mol %) der beiden PEG-MA ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) modifizierten und mit beiden Tensiden (SDS und Lutensol AT50) stabilisierten Polystyrol-Partikel. Inkubiert wurden diese Partikel bei 37°C mit HeLa-Zellen. Die Zeitreihe bestätigt die vorausgegangenen Durchflusszytometrie-Untersuchungen und lässt erkennen, dass die meisten Partikel (BR02, BR11, BR13, BR18, BR26) nach 8 h Inkubation ihren Sättigungswert erreicht haben und im Verlauf der weiteren Inkubation diesen Wert beibehalten. Der Partikel BR01 wird konstant weiterhin aufgenommen und hat seinen Sättigungswert nach 20 h Inkubation vermutlich noch nicht vollständig erreicht, auch wenn sich die Zunahme der Aufnahme deutlich verlangsamt. Der Abbildung 47 ist deutlich zu entnehmen, dass die mit Lutensol AT50 stabilisierten Partikel (BR02, BR13, BR26) dasselbe Aufnahmeverhalten unabhängig vom PEG-Einfluss zeigen.

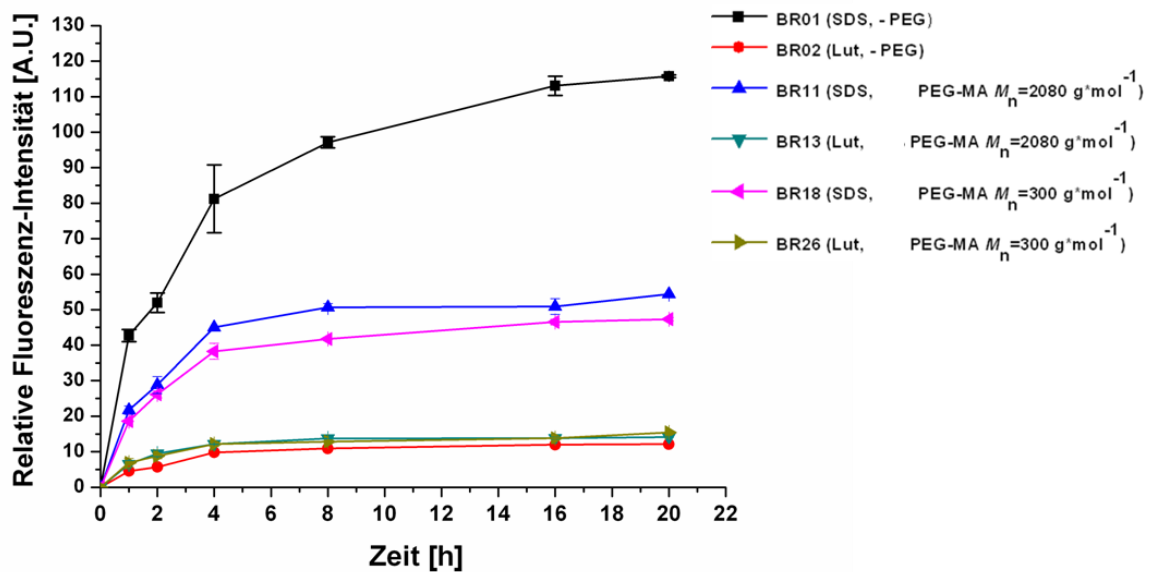


Abbildung 47: Darstellung der Inkubationskinetik von unterschiedlichen, PEGylierten Nanopartikeln in HeLa-Zellen bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ über einen Zeitraum von 20 h. Eingesetzt wurde 0,55 mol % PEG-MA. Die verwendeten Tenside sind SDS und Lutensol AT50 (Lut).

BR02 wurde ohne PEG-MA hergestellt, BR26 mit PEG-MA von $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und BR13 mit PEG-MA von $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die mit Lutensol AT50 stabilisierten Partikel zeigen die niedrigste Aufnahme. Die höchste Aufnahme ist für den nicht-PEGylierten, mit SDS stabilisierten Partikel BR01 zu verzeichnen. Ein mittleres Aufnahmeverhalten zwischen den beiden zuvor beschriebenen „extremen“ zeigen die mit SDS stabilisierten Partikel BR11 und BR18. Hier ist ferner kein Einfluss des Molekulargewichtes des eingesetzten PEG-MA (siehe BR11 mit PEG-MA $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und BR18 PEG mit $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), zu erkennen. Dennoch hemmt die Gegenwart des PEG die Aufnahme der Partikel deutlich im Vergleich zu BR01, welcher ohne PEG-MA synthetisiert wurde. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen die in der Literatur publizierten Ergebnisse, wonach für PEG nur eine geringe Zytotoxizität [174] nachgewiesen werden konnte und ebenfalls gezeigt wurde, dass PEG die Aufnahme in Zellen hemmt [169-171]. Bestätigt wurde ebenfalls, dass die mit SDS stabilisierten Partikeln

eine gute Aufnahme im Gegensatz zu den mit dem Tensid Lutensol AT50 stabilisierten Partikeln zeigen [186]. Der Einsatz von Lutensol AT50 reduziert die Aufnahme der Partikel effektiver als der Einsatz von kovalent gebundenem PEG mit Hilfe des Comonomers PEG-MA. Dies könnte daran liegen, dass die PEG-Kette im Falle des Comonomers tiefer im Partikel eingebaut ist und damit nicht frei an der Oberfläche vorliegt bzw. die Konzentration von PEG-Ketten an der Oberfläche deutlich geringer ist.

5.4.1.3 Erste Modifikation der Nanopartikel mit dem jeweils anderen Tensid und Untersuchungen per Durchflusszytometrie

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob eine Zugabe des gegenteiligen Tensids den zuvor beobachteten Effekt nachträglich verändert. Den zuvor mit SDS stabilisierten Partikeln wurde Lutensol AT50 zugegeben und umgekehrt den zuvor mit dem Tensid Lutensol AT50 stabilisierten Partikeln das Tensid SDS. Die jeweiligen eingesetzten Nanopartikel können der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzten, PEGylierten Nanopartikel. Die Synthese der Partikel erfolgte durch Beatrix Ruppel. Alle Partikel bestehen aus dem Monomer Styrol und der eingesetzte Initiator war für alle Partikel V59, der Fluoreszenz-Farbstoff PMI. Alle Partikel wurden nach der Synthese einer Dialyse zur Entfernung des freien Tensids unterzogen.

Bezeichnung	PEG-MA-Comonomer [mol %]	1.Tensid	2. Tensid	Größe [nm]
BR01-L	-	SDS	Lutensol AT50	102
BR02-CTMA-Cl	-	Lutensol AT50	CTMA-Cl	275
BR02-SDS	-	Lutensol AT50	SDS	277
BR04-SDS	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	Lutensol AT50	SDS	242
BR08-L	$M_n 2080 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	SDS	Lutensol AT50	97
BR15-L	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	SDS	Lutensol AT50	99
BR22-SDS	$M_n 300 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,08)	Lutensol AT50	SDS	280
BR01-05%	-	SDS	Lutensol AT50 (5 %)	201
BR01-10%	-	SDS	Lutensol AT50 (10 %)	204
BR01-25%	-	SDS	Lutensol AT50 (25 %)	204
BR01-50%	-	SDS	Lutensol AT50 (50 %)	202
BR01-100%	-	SDS	Lutensol AT50 (100 %)	205

Die Analyse dieser Untersuchung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Durchflusszytometers. Ein „Umkehr“-Effekt nach der Zugabe des jeweiligen Tensids zu den Polystyrol-Partikeln lässt sich nicht erkennen (Abbildung 48).

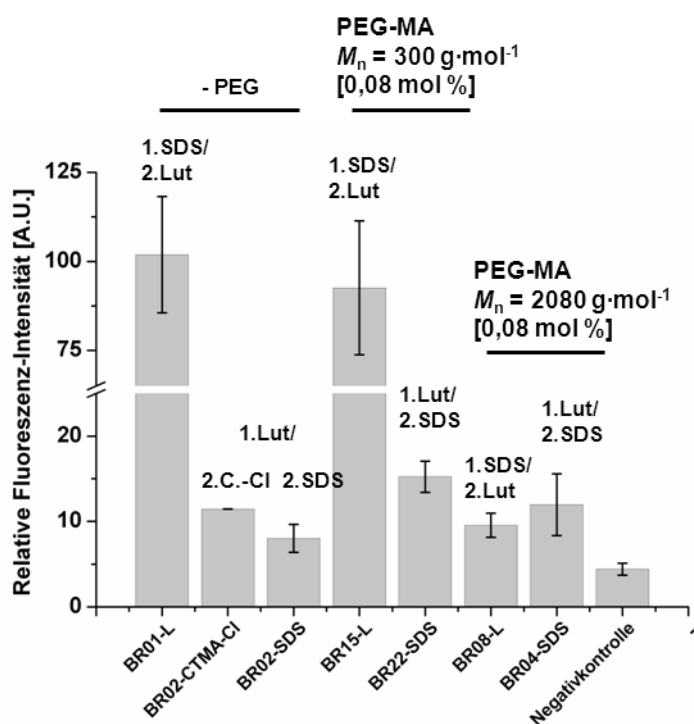


Abbildung 48: Aufnahme von PEGylierten Nanopartikeln, die mit einem weiteren Tensid (SDS, Lutensol AT50 (Lut), CTMA-CI (C.-CI)) modifiziert wurden, in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Die zuvor mit SDS stabilisierten, nicht-PEGylierten (BR01-Lut) und mit PEG-MA $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ versehenen Partikel (BR15-Lut) zeigen nach wie vor eine wesentlich höhere Aufnahme in HeLa-Zellen im Vergleich zu den mit Lutensol AT50 stabilisierten, nicht PEGylierten (BR02-SDS) und mit PEG $M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ versehenen Partikel (BR22). Im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle (NK) lässt sich die Aussage treffen, dass die Partikel BR02-SDS, BR02-CTMA-CI, BR22-SDS, BR08-Lut und BR04-SDS äußerst gering bis gar nicht aufgenommen werden. Bei den mit PEG $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ versehenen sowohl mit SDS (BR04) als auch mit

Lutensol AT50 (BR08) redispergierten Partikeln zeigen sich keine Unterschiede bezüglich des Aufnahmeverhaltens. Hier scheint der hemmende Effekt des PEG $M_n = 2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ den Tensid-Effekt zu überlagern. Zusätzlich wurde dem Partikel BR02 parallel auch das Tensid CTMA-CI (BR02-CTMA-CI) zugegeben. Auch hier zeigt sich keine Veränderung im Vergleich zu dem Aufnahmeverhalten des Ursprungpartikels BR02 (Abbildung 43 und 44). Für die hMSCs (Abbildung 49) lässt sich die gleiche Aussage treffen wie für die HeLa-Zellen.

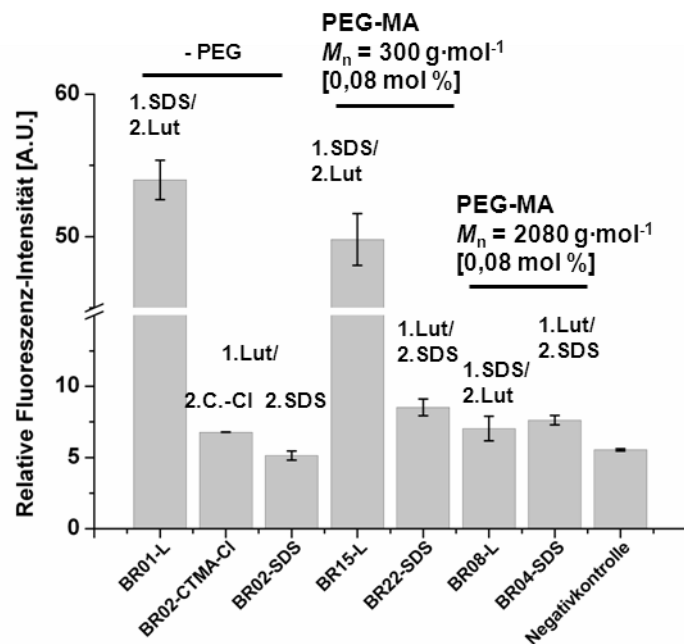


Abbildung 49: Aufnahme von PEGylierten Nanopartikeln, die mit einem weiteren Tensid (SDS, Lutensol AT50 (= Lut), CTMA-CI (= C.-CI)) modifiziert wurden, in hMSCs nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Eine Zytotoxizität konnte sowohl für die HeLa-Zellen (Abbildung 50 A) als auch für die hMSCs (Abbildung 50 B) nach Zugabe der mit jeweils mit einem zusätzlichen Tensid modifizierten Partikeln nicht nachgewiesen werden.

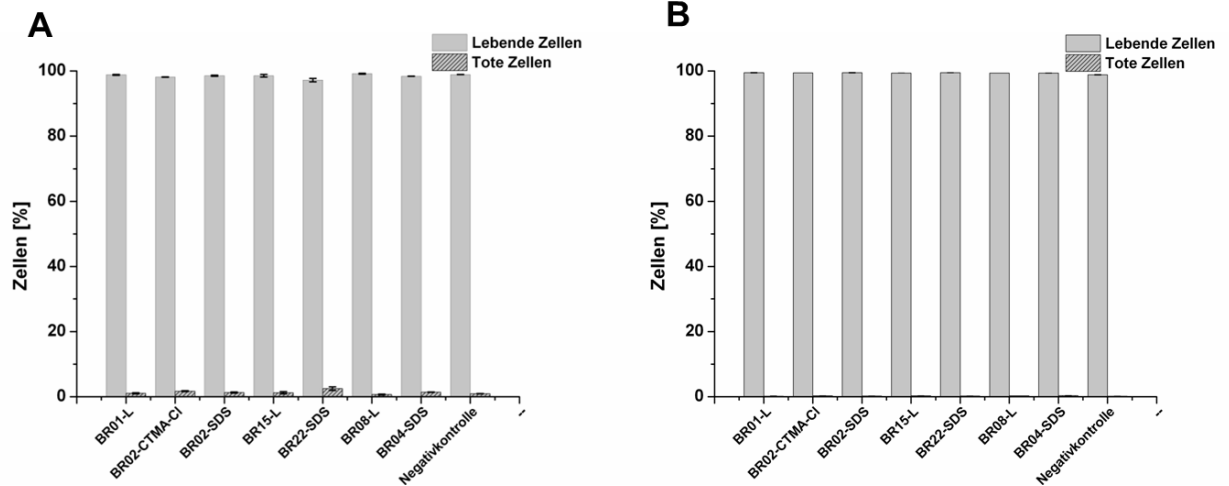


Abbildung 50: Viabilität von HeLa-Zellen (A) und humane Mesenchymale Stammzellen (B) nach 20 Stunden Inkubation mit $75\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Nanopartikeln.

5.4.1.4 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie-Studien zur Partikelaufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs

Verifiziert wurde die zuvor beschriebene Untersuchung (Kapitel 5.4.1.3) mit Hilfe von konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie-Bildern. Hierfür wurden HeLa-Zellen eingesetzt und ansonsten die zuvor beschriebenen Bedingungen ($75\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Feststoffgehalt der Partikel, 20 h Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) beibehalten. Die Bilder (Abbildung 51) bestätigen die mittels Durchflusszytometrie durchgeführte Analysen (Kapitel 5.4.1.3). Deutlich sind die grün fluoreszierende (PMI) Partikel BR01-Lut (Abbildung 51 A) und BR15-Lut (Abbildung 51 F) in den HeLa-Zellen zu erkennen. Für die anderen Partikel lässt sich innerhalb der Zellen keine Fluoreszenz nachweisen.

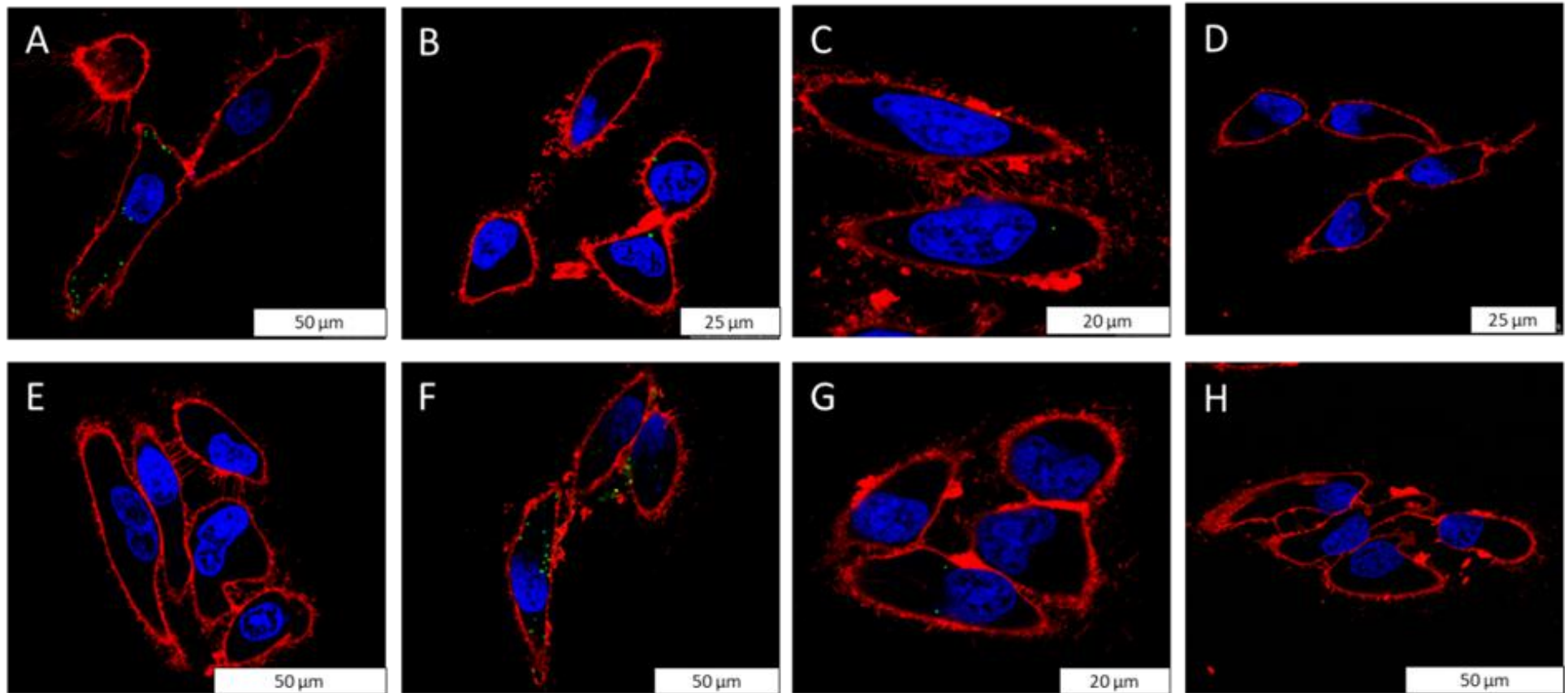


Abbildung 51: Aufnahme von Nanopartikel in HeLa-Zellen nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Partikel (PMI) erscheinen grün, die Zellmembran rot (CellMaskOrange) und der Zellkern blau (DraQ5). A: BR01-Lut; B: BR02-SDS; C: BR02-CTMA-Cl; D: BR04-SDS; E: BR08-Lut; F: BR15-Lut; G: BR22-SDS; H: Negativ-Kontrolle.

5.4.1.5 Zweite Modifikation des Polystyrolpartikels BR01 mit verschiedenen Mengen an Lutensol AT50 und Untersuchungen per Durchflusszytometrie

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich der Umkehreffekt mit einer steigenden Konzentration des Tensids Lutensol AT50 erzielen lässt, so dass die Aufnahme des zuvor mit SDS stabilisierten, gut aufgenommenen, nicht-PEGylierten Partikels BR01 abnimmt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie, und es wurde wie zuvor $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Feststoffgehalt an Partikeln eingesetzt und 20 h bei 37 °C inkubiert. Sowohl für die HeLa-Zellen (Abbildung 52 A) als auch für die hMSCs (Abbildung 52 C) konnte kein Einfluss der steigenden Lutensol AT50-Konzentrationen (0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100%) auf das Aufnahmeverhalten der Partikeln verzeichnet werden. Eine Toxizität konnte ebenfalls für beide Zelllinien (Abbildung 52 B und Abbildung 52 D) nicht nachgewiesen werden.

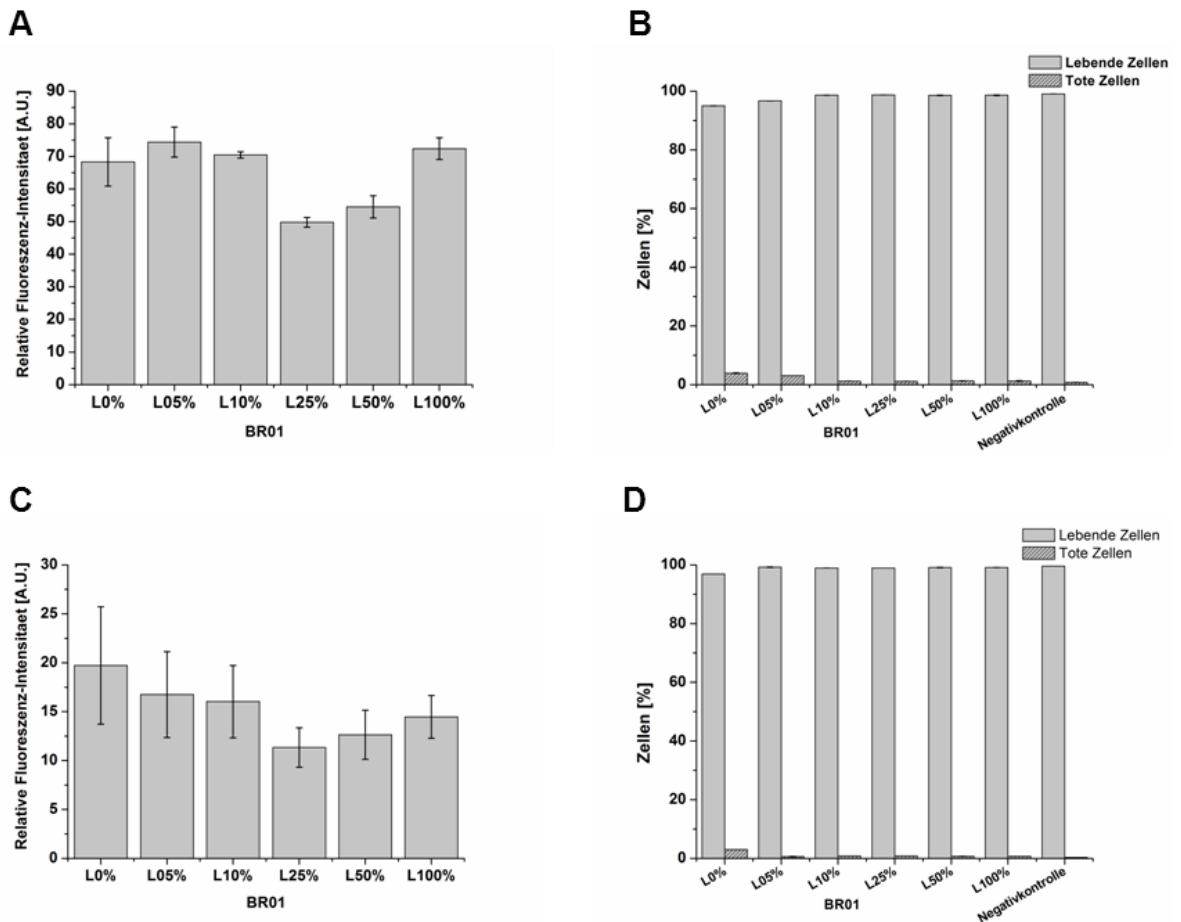


Abbildung 52: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von verschiedenen Modifikationen des ursprünglich mit SDS stabilisierten Nanopartikels BR01, denen unterschiedliche Konzentrationen an Lutensol AT50 (= L; 0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100%) zugegeben wurden, in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Nachfolgend ist zu bemerken, dass der Umkehreffekt eventuell mit höheren Tensid-Gaben zu erzielen ist. Um den Einfluss des Polymers PEG auf die Aufnahme der Partikel in Zellen effizienter untersuchen zu können, bietet sich aufgrund der geringen Anhaftung von PEG an Partikeloberflächen [176] der Einsatz von einer größeren Menge PEG an. Hierzu sind weitere Partikel-Modifikationen und daraus resultierende Studien erforderlich.

5.4.2 Biologisch abbaubare Nanokapseln aus vernetzten Biopolymeren (Proteine, ssDNA)

Nanokapseln stellen im Bereich des zielgerichteten Medikamententransports ein sehr interessantes neues Feld dar. Genau wie die zuvor vorgestellten Nanopartikeln können Nanokapseln mit einem entsprechenden Therapeutikum beladen werden, unterscheiden sich jedoch von den Nanopartikeln in ihrem Aufbau. Der Kapselinhalt befindet sich einheitlich in einem umhüllten Hohlraum [136]. Dies bietet die Möglichkeit, auch hydrophile Substanzen einzuschließen. Eine wichtige Eigenschaft von Nanokapseln ist deren Möglichkeit, sich nach entsprechender Modifikation im Zielgewebe gemäß dem die Kapseln umgebenden Milieu zu öffnen und ihren Inhalt freizusetzen [187-189]. Bekannt ist, dass der pH-Wert im extrazellulären Milieu von Tumorgewebe niedriger ist als der extrazelluläre pH-Wert von gesundem Gewebe [190]. Diese Tatsache lässt sich bezüglich der Nanokapseln insofern ausnutzen, indem die Nanokapseln so modifiziert werden, dass sie ihren Kapselinhalt nur in entsprechendem Milieu freisetzen. Hier ist die Verkapselung von pharmazeutischen Substanzen, ihr zielgerichteter Transport, ihre kontrollierte Freisetzung, der Schutz des Kapselinhalts vor unspezifischem Abbau im Blutkreislauf oder nach oraler Applikation vor der Magensäure durch die Hülle und letztlich die Bewahrung des Patienten vor unerwünschten Nebenwirkungen des eingesetzten Medikaments von großem Interesse [191-194]. Hierzu bedarf es jedoch grundlegender Untersuchungen, beispielsweise hinsichtlich des Zusammenwirkens der verwendeten Monomere und verschiedenen Zelllinien. Ein weiterer erstrebenswerter Punkt für die Suche nach neuen Polymeren zur Herstellung von Nanokapseln ist deren mögliche Bioabbaubarkeit. Hierzu wurden schon in mehreren Studien die Herstellung von biologisch abbaubaren Nanokapseln mit beispielsweise den Polymeren PLGA (Poly-lactid-co-glycol-acid), PCL (Polycaprolacton) [195], PBCA (Poly-n-butylcyanoacrylate) [196] oder anderen Polymeren [197] analysiert und deren Einsatz für Zellstudien untersucht [193, 196, 198, 199]. Weitere Beispiele für Nanokapseln aus biologisch abbaubaren Polymeren stellen Biopolymere auf Polysaccharid-Basis wie beispielsweise Chitosan dar [171, 197, 200, 201]. Schon in der Vergangenheit wurden

Nanokapseln aus biologischem Material, wie beispielsweise dem zu den Biopolymeren gehörenden Polyelektrolyt ssDNA hergestellt [202, 203], nachdem schon *Seeman et al.* 1982 eine Vision von der Verwendung von DNA als biologischem Baumaterial zur Imitation biologischer Systeme hatte [204]. Zusätzlich ist von mit Polyelektrolyten hergestellten Kapseln bekannt, dass sie von den meisten Zelllinien aufgenommen werden [205] und eine geringe bis gar keine Zytotoxizität zeigen [206]. Auf Grundlage dieser Überlegung ergab sich, neue Nanokapseln mit einer Hülle aus Proteinen herzustellen. Der Einsatz von Proteinen bei der Herstellung von Medikamenten ist schon länger bekannt [207-209], jedoch mit dem Problem behaftet, dass die Enzyme die Medikamente auf Proteinbasis nach oraler Applikation unverzüglich angreifen und zersetzen. Eine Möglichkeit, dieses Problem umzugehen, bot die Verkapselung der Proteine in Nanokapseln [210-212]. Für diese Studie jedoch wurden die Kapseln direkt mit Proteinen hergestellt und mit Hilfe von Tensiden so modifiziert, dass die Biokapseln erst innerhalb der Zellen zersetzt werden sollen. Nach all den bisherigen Studien mit Nanopartikeln, hergestellt mit verschiedenen Polymeren und unterschiedlich modifiziert, ergab sich die Überlegung, wie die Ergebnisse mit den gleichen Parametern, wie zum Beispiel eine Inkubationszeit von 20 h, bei Aufnahmestudien in HeLa-Zellen und hMSCs aussehen, wenn statt Nanopartikeln biologisch abbaubare, mit Proteinen hergestellte Nanokapseln eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden von Frau (...) (Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz) biologisch abbaubare Nanokapseln in inverser Miniemulsion synthetisiert. Als Schalenmaterial wurden jeweils verschiedene Proteine (zu entnehmen der Tabelle 8) eingesetzt. Die Nanokapsel BN-52 wurde mit FCS (engl. *Foetal calf serum*), BN-53 mit BSA (engl. *Bovine serum albumine*) und dem BSA-FITC-Komplex, BN-54 mit ssDNA, BN-55 und BN-56 mit Dithiol-ssDNA produziert. Als Vernetzer wurde für alle Nanokapseln TDI eingesetzt. Bis auf die Nanokapseln BN-55 und BN-56 wurden alle Nanokapseln ohne den Einsatz eines zweiten Vernetzermoleküls hergestellt. Bei dem Kapsel BN-55 stellte Octadiyne und bei Kapsel BN-56 Triglykol-Dichlorid den zweiten Vernetzer bei der Kapselhüllenbildung während des Bildungsprozesses dar (Strukturformeln der eingesetzten Vernetzer siehe Abbildung 53).

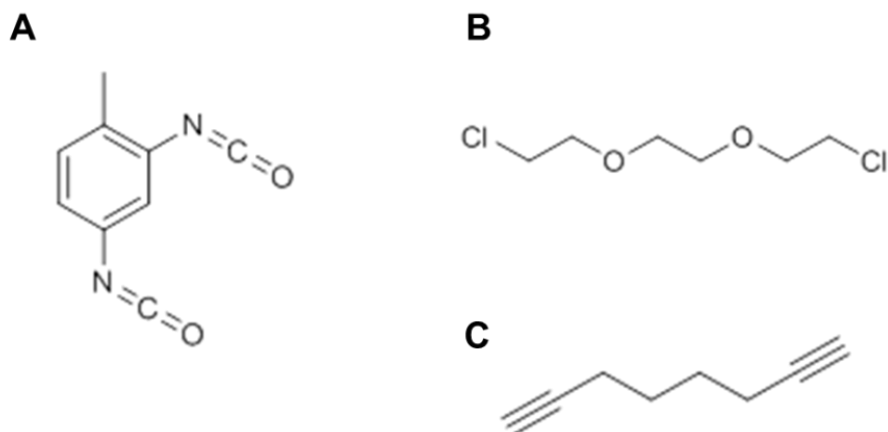


Abbildung 53: Strukturformel der Vernetzer TDI (A), Triglykol-Dichlorid (B) und Octadiyne (C).

Zur Überprüfung des Kapselbildungsprozesses wurden direkt im Anschluss von den Nanokapseln BN-52, -53 und -54 TEM-Bilder angefertigt (siehe Abbildung 54). Auf den TEM-Bildern sind die Nanokapseln mit einer weitgehend einheitlichen Größenverteilung gut zu erkennen. Nach der Verdampfung von Cyclohexan wurden die jeweiligen Nanokapseln sowohl mit SDS als auch mit Lutensol AT50 in Wasser redispergiert. Der Einsatz beider Tenside sollte den Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung zusätzlich zum Einfluss der Monomere auf die zelluläre Aufnahme der Nanokapseln zeigen.

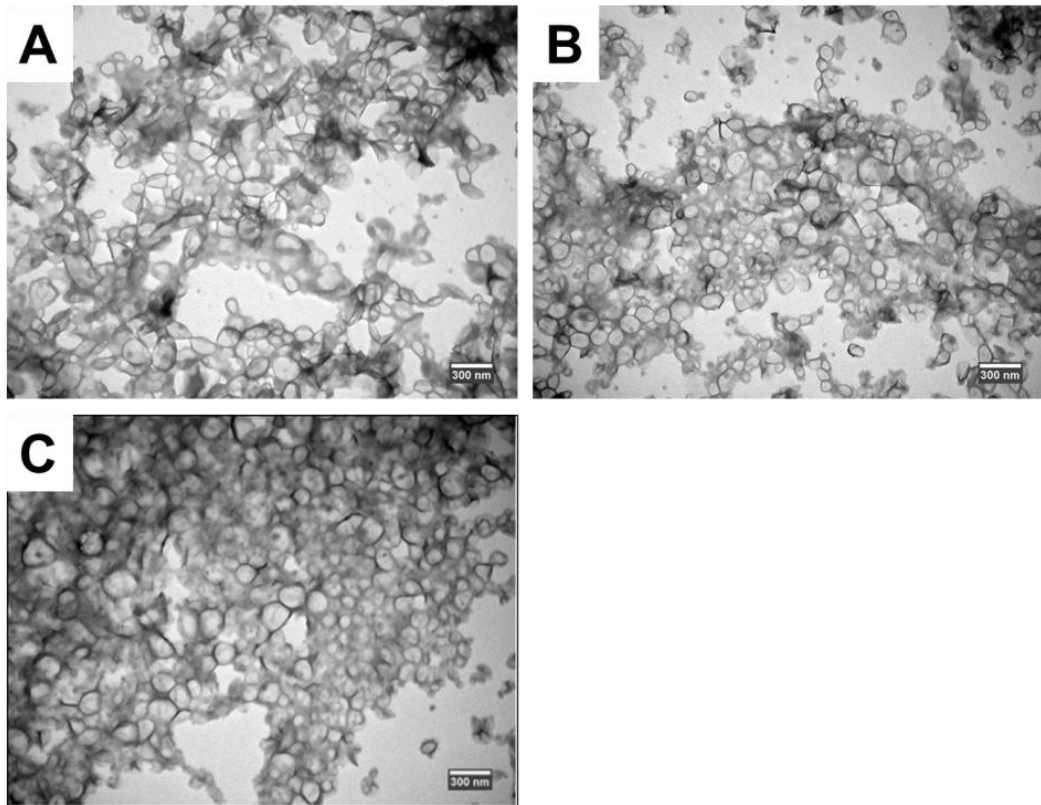


Abbildung 54: TEM-Aufnahmen der biologisch abbaubaren Nanokapseln BN-52 (A), BN-53 (B) und BN-54 (C). Von den Nanokapseln BN-55 und BN-56 existieren keine TEM-Bilder. Die Bilder wurden von Dr. Umaporn Paiphansiri erstellt.

Nach dem letzten Waschen mit destilliertem Wasser zur Entfernung des freien Tensids wurden die Kapseln für zelluläre Untersuchungen freigegeben.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendete Nanokapseln, eingesetzter Fluoreszenz-Farbstoff war für alle Kapseln FITC (Synthese der Kapseln von Dr. Umaporn Paiparanshi).

Bezeichnung	Monomer	Co-Monomer	Co-Monomer	Größe [nm]	Tensid	Zeta-Pot. [mV]
BN-52	FCS	TDI	-	264	SDS	-69
					Lut	-7,4
BN-53	BSA + BSA-FITC	TDI	-	119	SDS	-80
					Lut	-4,6
BN-54	ssDNA	TDI	-	118	SDS	-62,7
					Lut	-4,39
BN-55	Dithiol ssDNA	TDI	Octadiyne	149	SDS	-115
					Lut	-4,4
BN-56	Dithiol ssDNA	TDI	Triglykol-Dichlorid	195	SDS	-112
					Lut	-5,08

5.4.2.1 Nanokapselaufnahme und Toxizität im FACS

Die Analysen zur Aufnahme der biologisch abbaubaren Nanokapseln in Zellen wurden zunächst mittels Durchflusszytometrie für HeLa-Zellen und hMSCs durchgeführt. Dabei zeigte sich eine äußerst minimale bis gar keine Aufnahme sowohl für die in SDS als auch für die in Lutensol AT50 redispergierte Nanokapseln in HeLa-Zellen und hMSCs. In Anbetracht der sehr geringen zelluläre Aufnahme wird der in Lutensol AT50 redispergierte Nanokapsel BN-54 im Vergleich zu den anderen Nanokapseln immer noch am effizientesten von den HeLa-Zellen und hMSCs aufgenommen. Hinsichtlich der Zytotoxizität ist bei den in SDS redispergierten Nanokapseln für beide Zelllinien nur für die Nanokapseln BN-54 ein toxischer Einfluss zu verzeichnen. Auf die HeLa-Zellen wirkt sich zusätzlich die ebenfalls in SDS redispergierte Nanokapsel BN-55 toxisch aus. Die

in Lutensol AT50 redispersierten Kapseln hingegen zeigen für beide Zelllinien einen zytotoxischen Einfluss (Abbildung 55).

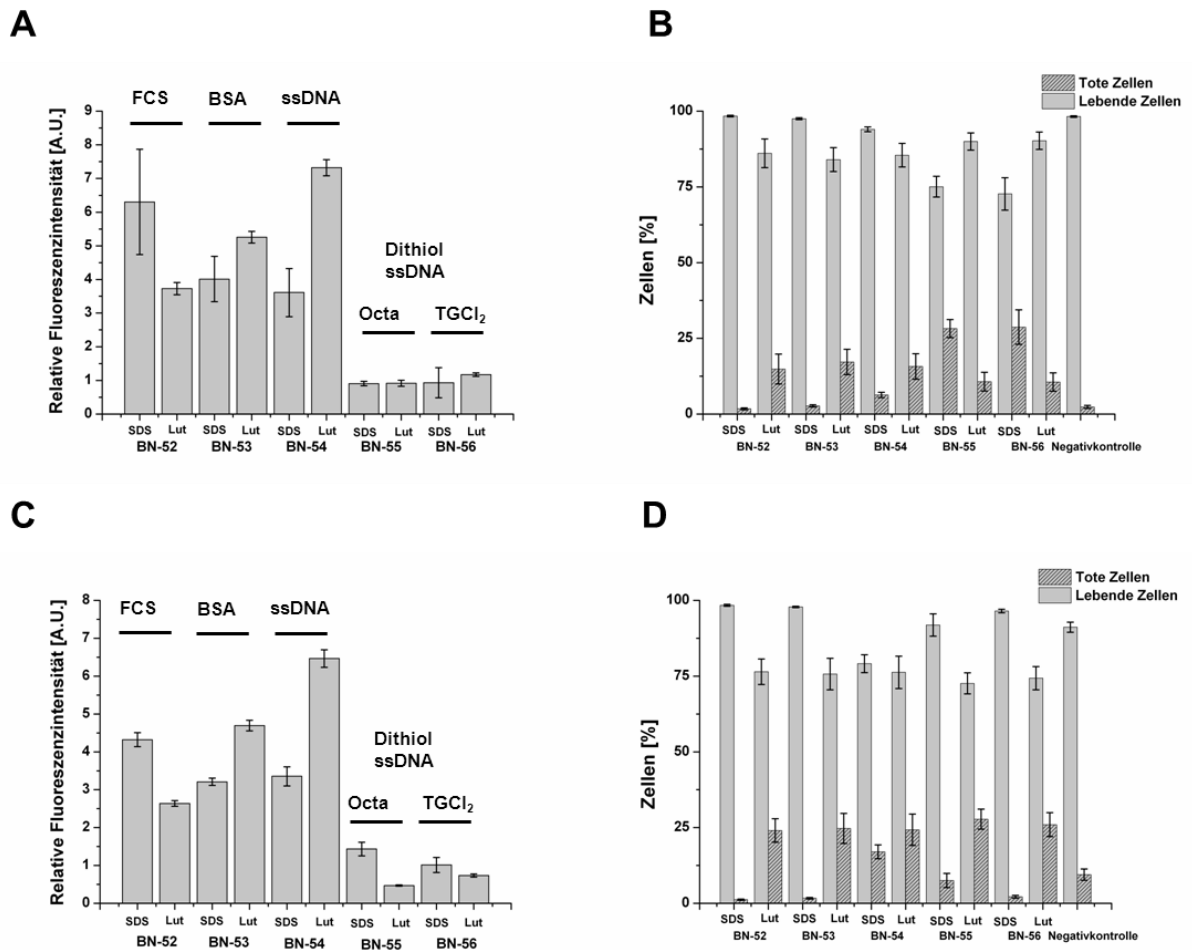


Abbildung 55: Aufnahme (A, C) und Viabilität (B, D) von mit SDS und Lutensol AT50 redispersierten Nanokapseln in HeLa-Zellen (A, B) und hMSCs (C, D) nach 20 h Inkubation bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Nanokapseln wurden aus FCS, BSA (BSA + BSA-FITC), ssDNA und dithiol ssDNA hergestellt. Der erste Vernetzer war für alle Kapseln TDI. Für BN-55 wurde als zweiter Vernetzer Octadiyne (Octa) und für BN-56 Triglykol-Dichlorid (TGCl₂) verwendet.

5.4.2.2 Nanokapselaufnahme im LSM

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen wurden direkt im Anschluss mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie verifiziert. Die aufgenommenen Bilder bestätigen die vorausgegangenen, mittels Durchflusszytometrie-Analysen erhaltenen Ergebnisse. In keiner Zelle konnten sowohl für die mit SDS (siehe Abbildung 56) als auch für die mit Lutensol AT50 (siehe Abbildung 57) redispergierten Kapseln aufgenommene Nanokapseln erkannt werden. Ein toxischer Einfluss des Tensids Lutensol AT50 konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie-Messungen nicht bzw. nur geringfügig verzeichnet werden. Die für Bildaufnahmen fokussierte hMSCs und HeLa-Zellen zeigen insgesamt eine normale Vitalität.

Abschließend lässt sich nach der Untersuchung der zellulären Aufnahme der biologisch abbaubaren Nanokapseln zusammenfassen, dass die aus Proteinen hergestellten, sowohl in Lutensol AT50 als auch in SDS redispergierten Nanokapseln eine sehr geringe bis keine Aufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs zeigen.

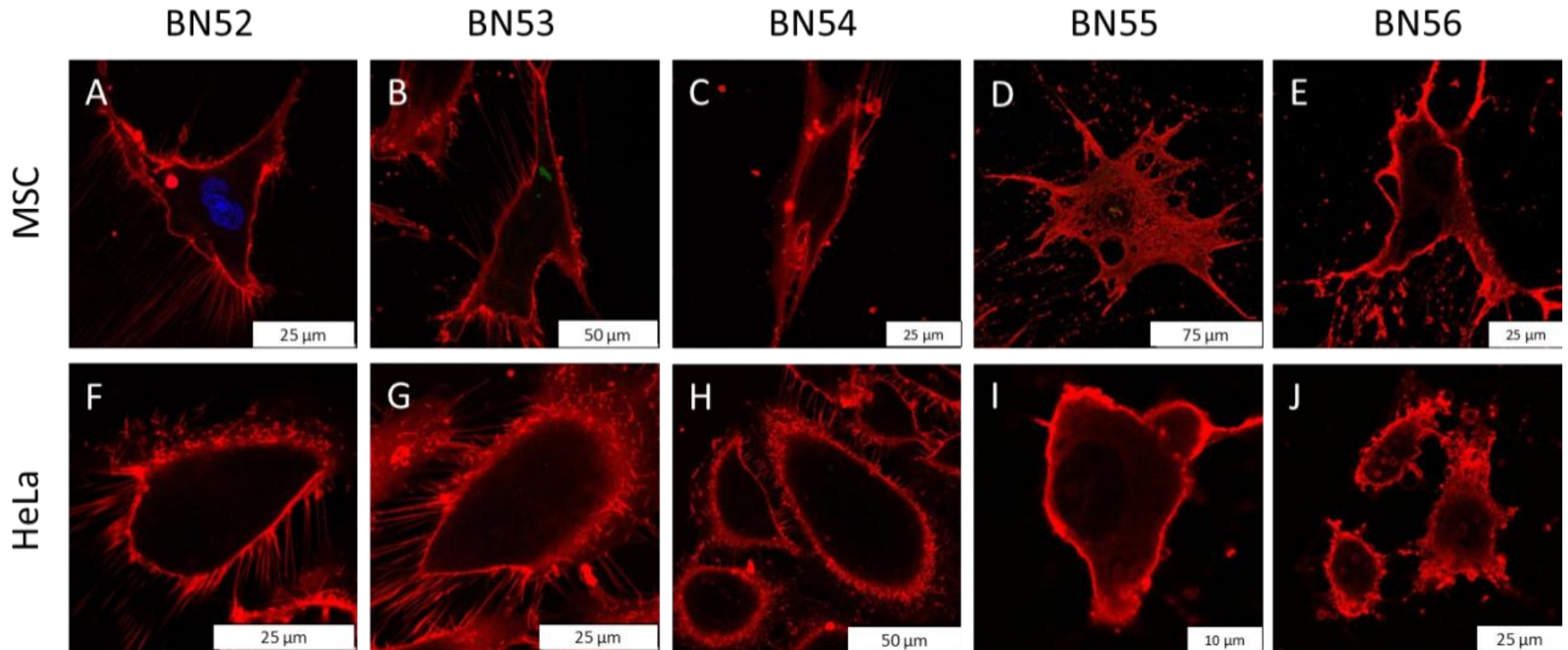


Abbildung 56: Intrazelluläre Aufnahmen von hMSCs (A-E) und HeLa-Zellen (F-J) nach einer 20stündigen Inkubation mit den mit SDS redispergierten Nanokapseln BN52 (A, F; FCS), BN53 (B, G; BSA + BSA-FITC), BN54 (C, H; ssDNA), BN55 (D, I; Dithiol ssDNA + Octadiyne) und BN56 (E, J; Dithiol ssDNA + TGCI2) bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Zellmembran wurde mit CellMask Orange (Rot) und der Zellkern mit DraQ5 (Blau) angefärbt. Die Nanokapseln sind grün (Fluorescein) dargestellt.

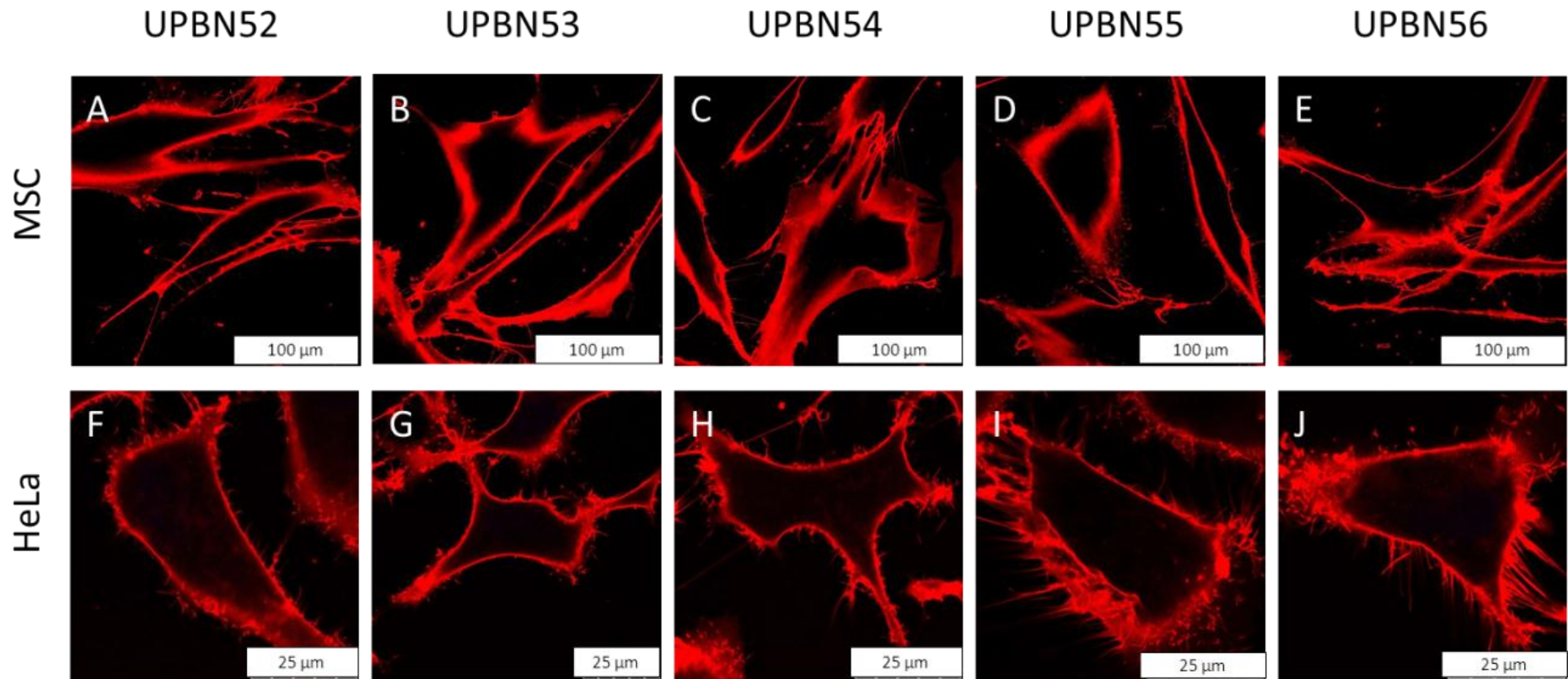


Abbildung 57: Intrazelluläre Aufnahmen von hMSCs (A-E) und HeLa-Zellen (F-J) nach einer 20stündigen Inkubation mit den mit Lutensol AT50 redispergierten Nanokapseln BN52 (A, F; FCS), BN53 (B, G; BSA + BSA-FITC), BN54 (C, H; ssDNA), BN55 (D, I; Dithiol ssDNA + Octadiyne) und BN56 (E, J; Dithiol ssDNA + TGCI2) bei einem Feststoffgehalt von $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Zellmembran wurde mit CellMask Orange (Rot) und der Zellkern mit DraQ5 (Blau) angefärbt. Die Nanokapseln sind grün (Fluorescein) dargestellt.

5.5 Vergleichende Analyse der Nanopartikel-Zellaufnahme und Zytotoxizität

Im Laufe der Zeit sammelte sich während der Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nanopartikeln und –kapseln und den eingesetzten Zelllinien eine sehr große Datenmenge an. Zusätzlich führten die Chemiker zahlreiche Analysen bezüglich der Materialeigenschaften durch. So galt es, all diese Erkenntnisse zusammenzuführen, in vergleichende Analysen einfließen zu lassen und auf diesem Weg Kernaussagen zu finden. Zu diesem Zweck wurde der Aufbau einer Datenbank generiert (siehe Anhang 8.1). Mit Hilfe der Datenbank können mit geringem Aufwand vergleichende Analysen durchgeführt werden.

5.5.1 Ergebnisse der vergleichenden Analyse

Die in den vorausgegangenen Kapiteln vorgestellten Studien bezogen sich jeweils auf das Projekt betreffende Fragestellungen. Auf Grund der Notwendigkeit, die Vergleichbarkeit zu wahren, wurden die auszuwählenden Eigenschaften für die nachfolgend vorgestellten vergleichenden Analysen auf die Eigenschaften Nanopartikel und den Fluoreszenzfarbstoff PMI beschränkt. Das Augenmerk fiel bei der Analyse auf die Zytotoxizität und auf die zelluläre Aufnahme der zusammengefassten Partikel. Ist die Menge der Aufnahme der Nanopartikel mit der Zytotoxizität gekoppelt? Gehen eine geringe Aufnahme mit einer geringen Zytotoxizität und eine hohe Aufnahme mit einer hohen Zytotoxizität einher? Eine Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 58). Hierbei war die Detektion des am effizientesten und des am geringsten aufgenommenen Partikels, der zugleich die geringste Zytotoxizität aufweist, von großem Interesse. Die Fluoreszenz-Intensitäten der von den Zelllinien HeLa-Zellen und hMSCs aufgenommenen Partikeln im Kontext und gleichzeitig in Relation zur Viabilität betrachtend, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die HeLa-Zellen insgesamt eine stärkere Aufnahme der Nanopartikel zeigen als die hMSCs (siehe Abbildung 58). Der Großteil der eingesetzten Partikel zeigt

insofern für beide Zelllinien keine Zytotoxizität, dass die Viabilität der Zellen bei mehr als 90% liegt.

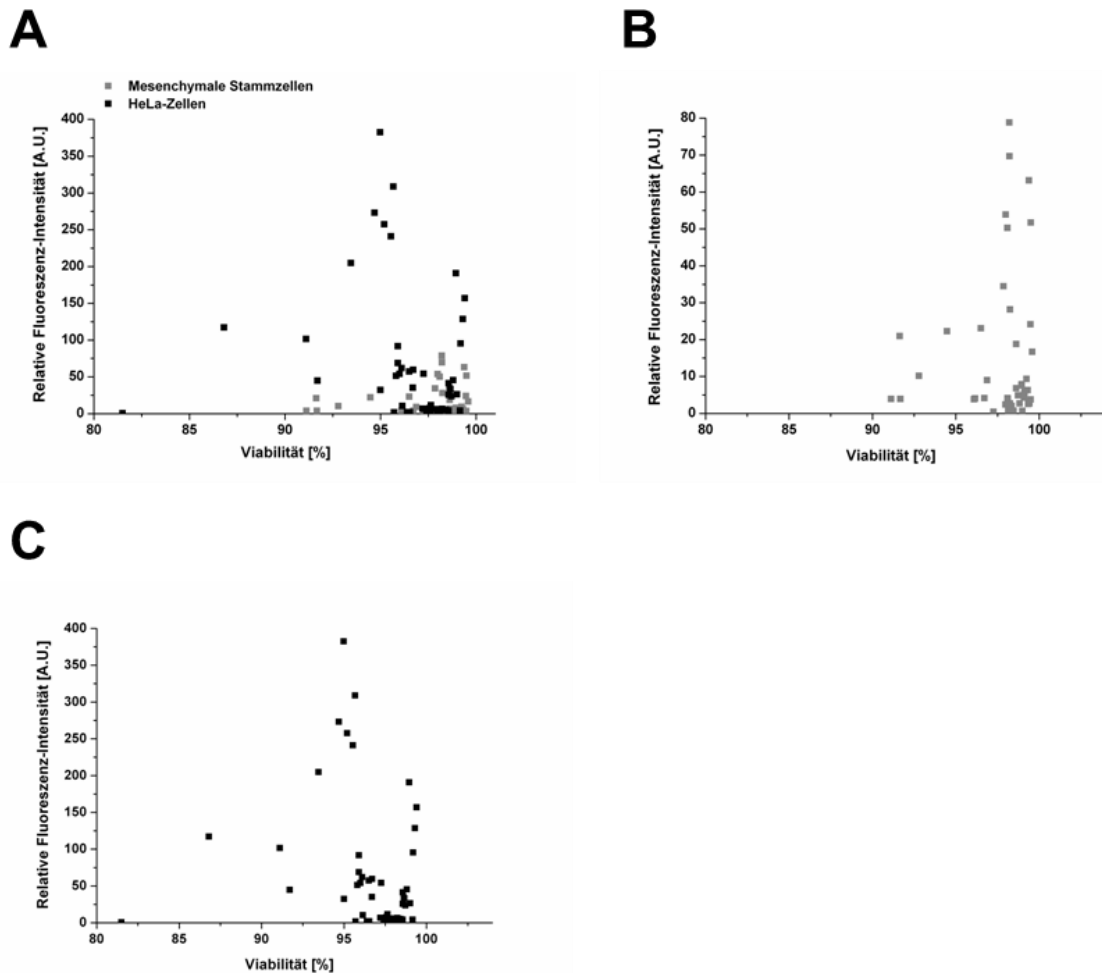


Abbildung 58: Graphische Darstellung der vergleichenden Analyse. A: Die Aufnahme- und Viabilität bei HeLa-Zellen und hMSCs. B: Eine vollständige Übersicht über die Aufnahme- und Viabilität bei hMSCs. Die Skala der y-Achse ist differenzierter dargestellt. C: Eine vollständige Übersicht über die Aufnahme- und Viabilität bei HeLa-Zellen.

Bei einer näheren Betrachtung der vergleichenden Analyse, in dem die Skalen der Y-Achse für die Fluoreszenz-Intensität und der X-Achse für die Viabilität der Zellen in Abschnitten dargestellt werden, fallen für die HeLa-Zellen zwei

zytotoxische Nanopartikel mit weniger als 90% vitale Zellen auf (siehe Abbildung 59 B, RS256 und Abbildung 59 C, AM-KG-41). Beim Rückschluss von der mittels Durchflusszytometrie gemessenen relativen Fluoreszenz-Intensität der in die HeLa-Zellen aufgenommenen Partikeln auf die Aufnahmeeffizienz der in die HeLa-Zellen aufgenommenen Nanopartikel zeigen der größte Teil der eingesetzten Nanopartikel eine geringe bis keine Aufnahme in die Zellen (siehe Abbildung 59 C). Die gleiche differenzierte Betrachtung der vergleichenden Analyse für die hMSCs zeigt ähnliche Ergebnisse (siehe Abbildung 60). Der größte Teil der eingesetzten Nanopartikel sind von der Aufnahmeeffizienz in die hMSCs ebenfalls im niedrigen Bereich anzusiedeln (siehe Abbildung 60 C). Eine Zytotoxizität kann für keinen Nanopartikel nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich resümieren, dass der größte Teil der eingesetzten Nanopartikel sowohl für die HeLa-Zellen als auch für die hMSCs keine Zytotoxizität zeigen. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Aufnahmeeffizienz, der damit einhergehenden Fluoreszenz-Intensität und der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Eine größere Aufnahmeeffizienz bewirkt keine größere Zytotoxizität und umgekehrt.

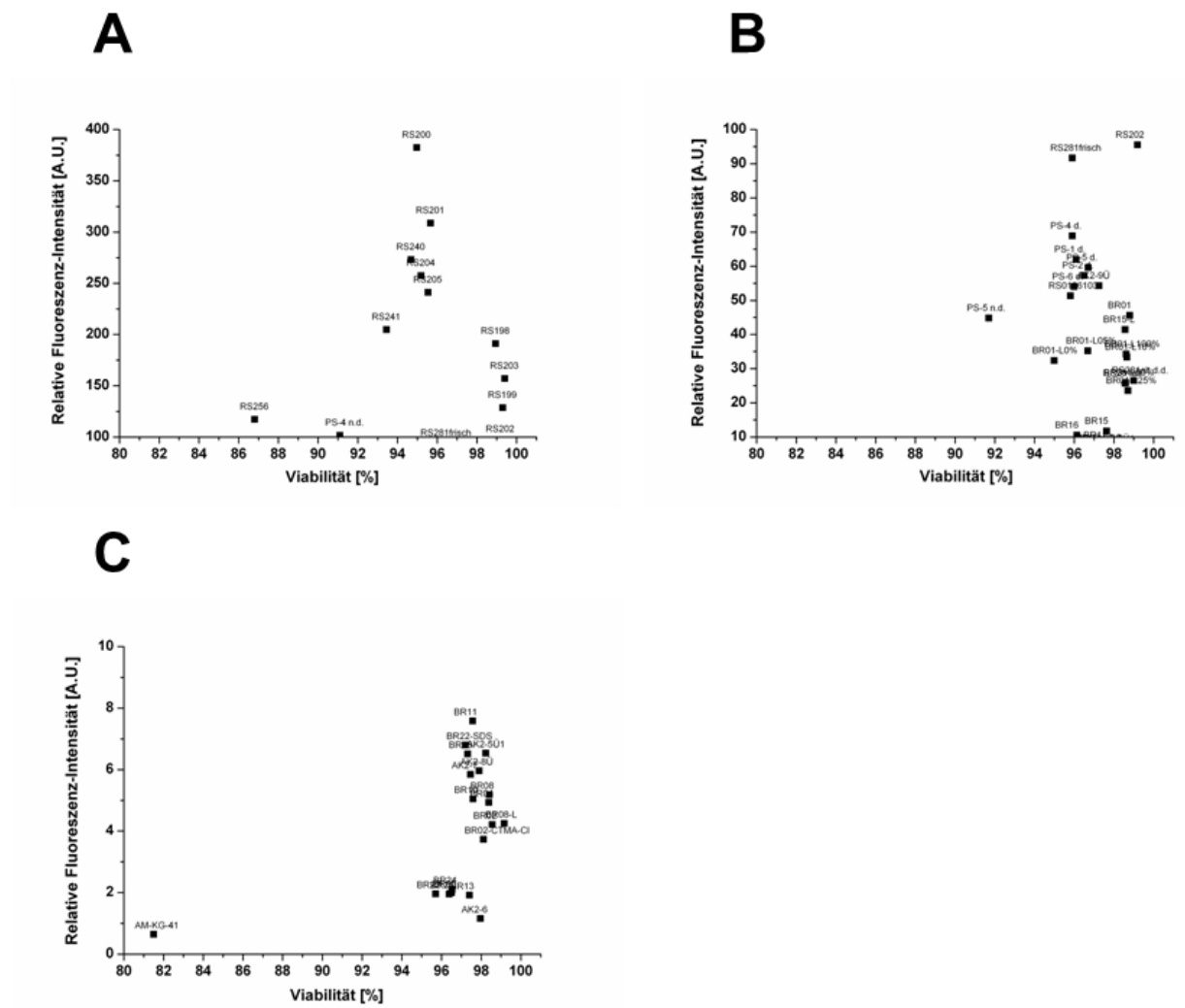


Abbildung 59: Darstellung der vergleichenden Analyse für HeLa-Zellen und mit PMI beladenen Nanopartikeln. A: Hohe Fluoreszenz-Intensitäten der aufgenommenen Nanopartikeln, B: Mittlere Fluoreszenz-Intensitäten der aufgenommenen Nanopartikeln, C: Niedrige Fluoreszenz-Intensitäten der aufgenommenen Nanopartikeln.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersucht Nanopartikel und Nanokapseln aus verschiedenen Materialien mit verschiedenen Modifikationen für einen zielgerichteten Medikamententransport (*Drug Targeting*). Obwohl bisher zahlreiche Nanopartikel und -kapseln synthetisiert wurden, besteht nach wie vor hinsichtlich der zellulären Verträglichkeit, Biokompatibilität und Aufnahme kein allumfassendes Verständnis. Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Ergebnissen soll ein Beitrag zur Schließung dieser Lücke geleistet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss der Herstellungsmaterialien PS, PLLA, PMMA, Biomakromoleküle (BSA, DNA), ggf. stabilisiert durch HPMA-LMA-Copolymere und neu-synthetisierte Surfmere, der Formmodifikationen Streckung und Kristallisierung, der Oberflächenmodifikationen mittels verschiedener Tenside und PEG auf die zelluläre Aufnahme und Verträglichkeit hin untersucht.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass zahlreiche Materialien zur Herstellung von Trägersystemen geeignet sind und sich als biokompatibel und nicht-zytotoxisch erwiesen haben, sich jedoch stark hinsichtlich der Aufnahmeeffizienz in verschiedene Zelllinien unterscheiden.

Im ersten Abschnitt (Kapitel 5.1) wurden in der ersten und zweiten Untersuchung auf allgemeine Parameter, die die Aufnahme von Nanopartikeln beeinflussen, eingegangen. Hier wurde der Einfluss des Alters von PLLA-Partikeln auf die zelluläre Aufnahme und Toxizität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Materialalterung die zelluläre Aufnahme abnimmt. Eine Zytotoxizität konnte nicht gezeigt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss des FCS-Gehalts des Zell-Mediums auf die zelluläre Aufnahme von PMMA-Partikeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer steigenden FCS-Konzentration eine Abnahme der zellulären

Aufnahme von PMMA-Partikeln einhergeht. Die höchste zelluläre Aufnahme konnte bei einem FCS-Gehalt des Zellmediums von 0,05% verzeichnet werden.

Im zweiten Abschnitt (Kapitel 5.2) wurde die Stabilisierung von Nanopartikeln mittels neusynthetisierter Tenside und deren Einfluss auf die Zelle-Nanopartikel-Interaktionen untersucht. Dazu wurde zum einen die Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln mit Hilfe neu-synthetisierter „Surfmere“ und deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme und Toxizität untersucht. Die hergestellten Surfmere bewirken gleichzeitig eine Stabilisierung und Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche mit Phosphonatgruppen. Hier wurden kovalente „Surfmer“ stabilisierte Nanopartikel mit Tensid- (SDP) stabilisierten Nanopartikeln verglichen. Zudem wurden dialysierte Nanopartikel mit nicht-dialysierten verglichen. Bezüglich der zellulären Aufnahme konnte für die mittels Dialyse gereinigten Nanopartikel eine gute Aufnahme ohne Unterschiede zwischen den kovalent und nicht-kovalent Phosphonat-funktionalisierten Partikeln beobachtet werden. Die ungereinigten, SDP-stabilisierte, nicht-kovalent gebundene Nanopartikel zeigten hingegen eine bis zu 30% stärkere Aufnahme in die HeLa-Zellen und hMSCs.

Weiterhin der Einsatz von mit HPMA-LMA-Copolymeren stabilisierte Polystyrol- und PLLA-Partikel, die den Einsatz von Tensiden während des Miniemulsionsprozesses überflüssig machen, untersucht. Auch hier konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Die Aufnahme in HeLa-Zellen scheint mehr von der Größe der Nanopartikel als vom verwendeten Material und in hMSCs mehr von den Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel abzuhängen.

Im dritten Abschnitt (Kapitel 5.3) wird auf die Möglichkeit der Formmodifikation von Polystyrol-Partikeln und deren Einfluss auf die Nanopartikel-Zelle-Interaktionen eingegangen. Es geht dabei um die Aufnahme und Zytotoxizität von verstreckten (elongierten) Polystyrol-Partikeln im Vergleich zu sphärischen Nanopartikeln, sowie die Aufnahme und Zytotoxizität von kristallinen Polystyrol-Partikeln in verschiedene Zelllinien. Bei den verstreckten Partikeln nimmt die Aufnahme-Effizienz in HeLa-Zellen und hMSCs mit zunehmender Verstreckung

ab. Eine Zytotoxizität konnte für keinen der erwähnten Nanopartikel nachgewiesen werden. Bei den Polystyrol-Partikeln unterschiedlicher Taktizität zeigen die kristallisierten Polystyrol-Partikel eine geringfügig besser Aufnahme-Rate als die nicht-kristallisierten Polystyrol-Partikel. Dabei zeigen die nach dem Herstellungsprozess mittels der Lösemittelverdampfungstechnik der wässrigen Phase entnommenen Partikel eine bessere Aufnahme als die nach der Verdampfung des Chloroforms verfügbaren Partikel. Insgesamt konnte jedoch für alle Polystyrol-Partikel trotz der unterschiedlichen Taktizitäten nach der Aufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs mittels Durchflusszytometrie hohe Fluoreszenz-Intensitäten verzeichnet werden. Setzt man hohe Fluoreszenz-Intensitäten bei in Zellen aufgenommenen Partikeln mit guten Aufnahmeraten gleich, sind die hier dargestellten Aufnahmeraten als sehr gut zu bezeichnen.

Auf Nanosysteme mit einer reduzierten zellulären Aufnahme wird im letzten Abschnitt (Kapitel 5.4) eingegangen. Dabei wird zum einen die unterschiedliche Oberflächenmodifikation von Polystyrol-Partikeln mit dem Co-Monomer PEG-MA und den Tensiden SDS und Lutensol AT50 untersucht. Von PEG-MA wurden zudem verschiedene Molekulargewichte ($M_n=300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M_n=2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und verschiedene Konzentrationen (1,5%, 5%, 10%) eingesetzt. Ein Teil der Partikel wurde mit SDS und der andere Teil mit Lutensol AT50 hergestellt. In einem weiteren Schritt wurde das jeweilig gegenteilige Tensid (statt SDS Lutensol AT50 und umgekehrt) eingesetzt, um zu überprüfen, ob sich der zuvor beobachtete Effekt umkehren lässt. Anschließend wurde ein erst mit SDS stabilisierter Nanopartikel (BR01) mit verschiedenen Lutensol AT50-Anteilen (5%, 10%, 25%, 50%, 100%) redispergiert. Die effizienteste Aufnahme zeigte der unmodifizierte, mit SDS stabilisierte Nanopartikel BR01, die niedrigste der ebenfalls unmodifizierte, mit Lutensol AT50 stabilisierte Nanopartikel BR02. Eine steigende Konzentration des PEG-MA $M_n=300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ hemmt die Aufnahme von mit SDS stabilisierten Partikeln konstant. Für PEG-MA $M_n=2080 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ konnte hingegen kein Einfluss nachgewiesen werden. Für die mit Lutensol AT50 stabilisierten Partikel konnte kein Einfluss von PEG-MA nachgewiesen werden. Daraus resultiert, dass der Einsatz von physikalisch adsorbiertem Lutensol AT50

die zelluläre Aufnahme effektiver hemmt als der Einsatz von kovalent gebundenem PEG-MA unterschiedlicher Kettenlänge.

Der Einsatz von mit Biomakromolekülen hergestellten Nanokapseln, die mit zwei verschiedenen Tensiden (SDS und Lutensol AT50) stabilisiert wurden, wurde im Weiteren näher untersucht. Bei den mit SDS stabilisierten Kapseln erwiesen sich die mit ssDNA hergestellten Kapseln BN-54 und BN-55 als leicht toxisch für die HeLa-Zellen. Dagegen sind alle eingesetzten, mit Lutensol AT50 redispergierten Nanokapseln sowohl für HeLa-Zellen als auch für hMSCs zytotoxisch. Hier ist die toxische Wirkung auf das nicht-ionische Tensid Lutensol AT50 zurückzuführen. Eine zelluläre Aufnahme konnte für keine mit Biomakromolekülen hergestellten Nanokapsel nachgewiesen werden.

Den Abschluss der Untersuchungen bildet die vergleichende Analyse der in dieser Arbeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff PMI versehenen Partikeln hinsichtlich deren Aufnahme in HeLa-Zellen und hMSCs und deren zytotoxische Auswirkungen. In der vergleichenden Analyse werden die zuvor vorgestellten Ergebnisse für PMI-Partikeln nochmal im Kontext betrachtet. Dabei erwies sich sowohl für die HeLa-Zellen als auch für die hMSCs, dass die meisten Partikel eine geringe bis keine zelluläre Aufnahme zeigen. Eine gute Aufnahme konnte nur für wenige Nanopartikel (vor allem für die kristallinen Nanopartikel) verzeichnet werden. Eine Korrelation zwischen der Aufnahmeeffizienz und der Zytotoxizität konnte nicht nachgewiesen werden.

7 Summary

This dissertation investigates nanoparticles and nanocapsules of various materials with various modifications for targeted drug delivery. Although previously numerous nanoparticles and capsules were synthesized, with regard to the cellular tolerability and biocompatibility no comprehensive understanding exists, yet. The presented results in this dissertation will help to close this gap.

Within the framework of this dissertation, the influence of the manufacturing materials PS, PLLA, PMMA, biomacromolecules (BSA, DNA), optionally stabilized by HPMA-LMA copolymers and newly synthesized surfmers, the influence of shape modifications like stretching and crystallization, surface modification by means of various surfactants and PEG on cellular uptake and compatibility was tested.

In summary, numerous materials are suitable to produce carrier systems and have shown to be biocompatible and non-cytotoxic, but differ widely in the uptake efficiency in various cell lines.

In the first and second part general parameters that affect the uptake of nanoparticles were addressed. The first study deals with the influence of age of PLLA particles on cellular uptake and toxicity. With increasing material aging the cellular uptake decreases. Cytotoxicity could not be shown.

The second study shows the influence of the FCS content in cell medium on cellular uptake of PMMA particles. In this study, it was shown that an increasing FCS concentration is accompanied by a decrease in cellular uptake of PMMA particles. The highest cellular uptake was found at a FCS concentration of 0.05%.

The third and fourth part were performed to investigate the stabilization of nanoparticles by the use of newly synthesized surfactants and their influence on cell-nanoparticle interactions. The influence of surface functionalization of particles using newly-synthesized Surfmers on cellular uptake and toxicity will be discussed in the third study. The prepared Surfmers cause functionalization of the nanoparticle surface with phosphonate groups. Moreover dialyzed

nanoparticles were compared with non-dialyzed. After having detected a lower cytotoxicity for the surfactant SDP than for the surfactant SDS, a low toxicity with about 10% of dead cells was detected for the non-dialyzed and no cytotoxicity for the dialyzed particles. With respect to the cellular uptake of the nanoparticles purified by dialysis a good uptake without differences between the covalent and non-covalent phosphonate functionalized particles was shown. However, the unpurified, SDP stabilized, non-covalently bound nanoparticles showed up to 30% greater uptake in the HeLa cells and hMSCs.

The fourth part dealt with the use of polystyrene and PLLA particles stabilized with HPMA-LMA-copolymers, which make the use of surfactants during the miniemulsion process unnecessary. Here too, no cytotoxicity was detected. Uptake in HeLa cells seems to depend more on the size of the nanoparticles than on the used material, while uptake in hMSCs seems to be more dependent on the surface properties of the nanoparticles. The fifth and sixth part deals with the possibility of modifying the form of polystyrene particles and their influence on the nanoparticle-cell interactions. This involves the uptake and cytotoxicity of stretched polystyrene particles and the uptake and cytotoxicity of crystalline polystyrene particles in various cell lines. For the stretched particles the uptake efficiency in HeLa cells and hMSCs increases with the stretching factor. Cytotoxicity was not detected for any of the mentioned nanoparticles. For polystyrene particles of different tacticity, syndiotactic polystyrene particles have a slightly better uptake rate than atactic polystyrene particles. Particles manufactured with the extracted solvent evaporation technique of the aqueous phase show a better internalisation than particles from the chloroform phase. However, for all polystyrene particles, despite the different tacticity, high fluorescence intensities were recorded by flow cytometry after uptake in HeLa cells and hMSCs. By equating high fluorescence intensities recorded in cells with good uptake rates, the uptake rates shown here can be described as very good.

Nanosystems with a reduced cellular uptake are discussed in the final two parts. The different surface modification of polystyrene particles with the co-monomer

PEG-MA and the surfactants SDS and Lutensol AT50 is examined. Additionally, different molecular weights ($M_n = 300 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $M_n = 2080 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) and various concentrations (1.5%, 5%, 10%) of PEG-MA were used. One part of the particles was prepared with SDS and the other part with Lutensol AT50. In a further step, the respective opposite surfactant (SDS instead of Lutensol AT50 and vice versa) was used to look whether the previously observed effect can be reversed. Subsequently nanoparticles stabilized with SDS (BR01) were redispersed with various Lutensol AT50 concentrations (5%, 10%, 25%, 50%, 100%). The unmodified, with SDS stabilized nanoparticle BR01 showed the most efficient uptake, while the lowest uptake was observed for the also unmodified, with Lutensol AT50 stabilized nanoparticle BR02. An increasing concentration of PEG-MA $M_n = 300 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ inhibits the uptake of particles stabilized with SDS constantly. For PEG-MA $M_n = 2080 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, however, no influence could be detected. For the particles stabilized with Lutensol AT50 no influence of PEG-MA could be detected. This shows that the use of Lutensol AT50 inhibits the cellular uptake more effectively than the use of PEG-MA with different chain lengths.

Nanocapsules produced with the use of biomacromolecules which were stabilized with two different surfactants (SDS and Lutensol AT50) were screened in more detail below. For the capsules stabilized with SDS, the capsules BN 54 and BN 55, produced with ssDNA, proved to be slightly toxic for HeLa cells. In contrast, all employed nanocapsules, redispersed with Lutensol AT50 are cytotoxic for both HeLa cells and hMSCs. Here the toxic effect is due to the non-ionic surfactant Lutensol AT50. No cellular uptake could be detected for any nanocapsules manufactured with biomacromolecules.

The last part compares different particles bearing the fluorescent dye PMI regarding their uptake in HeLa cells and hMSCs and their cytotoxic effects. In this comparative analysis the previously presented results for PMI particles are again put into context. Thereby, it has been shown, that most particles show little or no cellular uptake for both HeLa cells and hMSCs. A good uptake was recorded only for a few nanoparticles (especially for the crystalline nanoparticles). A correlation between the uptake efficiency and the cytotoxicity could not be proven.

8 Anhang

8.1 Übersicht über die für die vergleichende Analyse eingesetzten Nanopartikeln

Tabelle 9: Übersicht über die für die vergleichende Analyse eingesetzten Nanopartikeln. Die allen aufgeführten Nanopartikeln gemeinsame Kriterien sind zum einen der Farbstoff PMI und der Partikel-Typ (Nanopartikel).

Bezeichnung	Monomer/ Polymer	1. Tensid	2. Tensid	Größe [nm]	Zytotoxizität [%]				Relative Fluoreszenzintensität [A.U.]	
					HeLa-Zellen		hMSCs		HeLa-Zellen	hMSCs
					Lebend	Tot	Lebend	Tot		
BR08-L	Styrol	SDS	Lutensol AT50	97,2	99,16	0,68	99,36	0,29	4,3	3,15
BR04	Styrol	Lutensol AT50	-	97,2	98,38	1,4	99,34	0,32	4,9	3,41
PS-4 n.d.	Styrol	SDP	-	98	91,1	8,83	91,12	8,83	101,6	6,31
PS-4 d.	Styrol	SDP	-	98	95,9	4,05	99,31	0,72	68,9	4,30
BR15-L	Styrol	SDS	Lutensol AT50	99,1	98,56	1,24	99,38	0,31	41,4	22,27
AK2-9Ü	P(HPMA)-co- P(LMA)	-	-	100	97,25	2,72	98,82	1,14	54,3	12,41
BR11	Styrol	SDS	-	101	97,57	2,68	98,29	1,53	7,6	2,72

Anhang

AM-KG-41	Styrol	Lutensol AT50	-	104	81	19	-	-	0,65	-
BR08	Styrol	SDS	-	104	98,41	1,81	98,46	1,39	5,2	2,01
BR15	Styrol	SDS	-	105	97,63	2,69	98,24	1,55	11,7	4,91
PS-5 d.	Styrol	C12-PET	-	107	91,7	8,3	99,08	0,94	44,8	4,08
PS-5 n.d.	Styrol	C12-PET	-	107	95,81	4	91,67	8,3	51,4	3,91
BR01-L0%	Styrol	SDS	-	108	94,99	3,92	96,87	3,04	32,3	9,34
BR01	Styrol	SDS	-	108	98,8	1,05	99,48	0,2	45,6	24,15
BR16	Styrol	SDS	-	112	96,14	4,39	98,73	1,4	10,5	4,19
BR10	Styrol	SDS	-	113	97,59	2,55	98,34	1,54	5,1	1,81
PS-2 d.	Styrol	C12-PET	-	114	96,5	3,36	96,5	3,36	57,3	3,83
PS-1 d.	Styrol	SDP	-	118	96,1	3,82	96,09	3,82	62,00	4,15
BR18	Styrol	SDS	-	125	97,32	2,85	98,1	2,04	6,52	2,42
RS281alt	PLLA	SDS	-	131	98,56	1,41	91,63	8,88	25,75	10,19
RS281alt d.d.	PLLA	SDS	-	131	99	0,99	92,79	7,73	26,53	9,02
RS281frisch	PLLA	SDS	-	132	95,9	4,04	96,15	7,84	91,67	20,98
RS204	Polystyrol	SDS	-	134	95,19	5,61	98,24	1,75	257,62	50,29

Anhang

RS256	PLLA	SDS	-	135	86,8	8,22	99,49	0,55	117,14	23,08
RS200	Polystyrol	SDS	-	136	94,97	6,3	97,85	2,14	382,51	78,83
RS205	Polystyrol	SDS	-	137	95,54	5,2	98,09	1,94	241,14	53,89
RS198	Polystyrol	SDS	-	140	98,94	1,23	94,47	5,54	191,01	34,46
RS201	Polystyrol	SDS	-	143	95,67	5,19	98,2	1,62	308,86	63,18
RS199	Polystyrol	SDS	-	144	99,3	0,8	-	-	128,55	-
RS203	Polystyrol	SDS	-	145	99,4	0,78	99,58	0,62	157,01	28,15
RS202	Polystyrol	SDS	-	145	99,19	1	99,38	0,71	95,50	16,68
RS240	Polystyrol	SDS	-	148	94,68	5,31	97,99	1,95	273,15	69,72
RS241	Polystyrol	SDS	-	148	93,45	6,55	98,21	2,13	204,82	51,75
BR01-L05%	Polystyrol	SDS	Lutensol AT50	201	96,69	3,09	99,23	0,64	35,22	7,93
BR01-L50%	Polystyrol	SDS	Lutensol AT50	202	98,59	1,32	99,11	0,75	25,82	5,98
BR01-L10%	Polystyrol	SDS	Lutensol AT50	204	98,65	1,24	98,95	0,88	33,35	7,59
BR01-L25%	Polystyrol	SDS	Lutensol AT50	204	98,71	1,16	98,94	0,88	23,57	5,37

Anhang

BR01-L100%	Polystyrol	SDS	Lutensol AT50	205	98,62	1,27	99,12	0,75	34,26	6,85
BR02-CTMA-Cl	Styrol	Lutensol AT50	CTMA-Cl	277,2	98,11	1,71	99,41	0,3	3,73	2,58
BR22-SDS	Styrol	Lutensol AT50	SDS	280,2	97,2	2,5	99,5	0,25	6,80	3,81
BR13	Styrol	Lutensol AT50	-	285	97,41	2,57	98,25	1,6	1,92	0,73
BR06	Styrol	Lutensol AT50	-	286	96,51	3,69	98,62	1,27	1,99	0,75
BR02	Styrol	Lutensol AT50	-	294	98,55	1,3	99,47	0,23	4,22	2,69
BR24	Styrol	Lutensol AT50	-	294	96,53	3,5	98,45	1,63	2,10	0,76
BR26	Styrol	Lutensol AT50	-	309	96,39	3,59	98,14	1,96	1,96	0,72
BR22	Styrol	Lutensol AT50	-	316	95,7	4,36	97,98	2,12	1,96	0,71
AK2-7	PLLA	pHPMA-co-pLMA	-	550	97,46	2,46	97,25	2,65	5,85	18,79
AK2-5Ü1	Polystyrol	pHPMA-b-pLMA	-	600	98,23	1,71	98,99	0,89	6,54	3,89
AK2-6	Polystyrol	pHPMA-co-pLMA	-	750	97,96	1,96	98,11	1,06	1,16	0,46
AK2-8Ü	PLLA	pHPMA-b-pLMA	-	800	97,9	2,06	98,62	1,31	5,97	2,73

9 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Bzw.	Beziehungsweise
%	Prozent
°C	Grad-Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
7AAD	7-Aminoactinomycin-D
A.U.	Willkürliche Einheiten (engl. <i>arbitrary units</i>)
aPS	Ataktisches Polystyrol
BSA	Bovines Serumalbumin (engl. <i>Bovine serum albumine</i>)
Chem.	Chemisch
cLSM	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTMA-Cl	Cetyltrimethylammoniumchlorid
d.d.	Doppelt dialysiert
DLS	Dynamische Lichtstreuungsmessung
DMEM	Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleinacid</i>)
DPBS	Engl. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen
Engl.	Englisch
EPR	Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention (engl. <i>enhanced permeability and retention effect</i>)
<i>Et al.</i>	und andere (lat. <i>Et alii</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (engl. <i>Fetal calf serum</i>)

FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz-Kanal
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
Ggf.	Gegebenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle (engl. <i>Human mesenchymal stem cell</i>)
HPMA	Hydroxypropyl-methacrylamid
HSA	Humanes Serumalbumin (engl. <i>Human serum albumine</i>)
<i>In vitro</i>	Lat., im Glas
<i>In vivo</i>	Lat., im Lebendigen
k.	Kristallin
Lat.	Lateinisch
Ig	Immunglobulin
LMA	Laurylmethacrylat
Lsgm.- Verd.	Lösungsmittelverdampfungs-Technik
Lut	Lutensol AT50
min	Minute
ml	Milliliter
M_n	Molekulare Masse ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
MPS	Mononukleärer Phagozytensystem
mV	Millivolt

mW	Milliwatt
n.d.	Nicht dialysiert
n.k.	Nicht kristallin
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
Octa	Octadiyne
PBCA	Poly-n-butylcyanoacrylate
PCL	Polycaprolacton
PEG	Polyethylenglykol
PEG-MA	Polyethylenglykol-Methacrylat
Phasensep.	Phasenseparation
PLGA	Poly-lactid-co-glycol-acid
PLLA	Poly-L-Lactid
PMI	N-(2,6-diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarbonacidimid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photoelektronenvervielfacher (engl. <i>Photomultiplier</i>)
PS	Polystyrol
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskop
S	Streckung
SDP	<i>Sodium dodecylphosphonic acid</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sPS	Syndiotaktisches Polystyrol
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Single stranded desoxyribonucleinacid</i>)
SSNa	Natriumstyrolsulfonat
T	Temperatur

TDI	Toluol-2,4-diisocyanat
TEM	Transelectronen-Mikroskop
T_g	Glasübergangstemperatur (°C)
TGCl ₂	Triglykol-Dichlorid
z.B.	Zum Beispiel
α-MEM	Engl. <i>Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification</i>
λ	Wellenlänge (nm)

10 Literatur

- [1] Tran N, Webster TJ. Increased osteoblast functions in the presence of hydroxyapatite-coated iron oxide nanoparticles. *Acta Biomater* 2011;7:1298-306.
- [2] Ugelstad J, Elaasser MS, Vanderho.Jw. Emulsion Polymerization - Initiation of Polymerization in Monomer Droplets. *J Polym Sci Pol Lett* 1973;11:503-13.
- [3] Abismail B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem* 1999;6:75-83.
- [4] Behrend O, Ax K, Schubert H. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrason Sonochem* 2000;7:77-85.
- [5] Maa YF, Hsu CC. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharmaceutical development and technology* 1999;4:233-40.
- [6] 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.
- [7] Landfester K. Polyreactions in miniemulsions. *Macromol Rapid Comm* 2001;22:896-936.
- [8] Landfester K. Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. *Angew Chem Int Edit* 2009;48:4488-507.
- [9] Sanders E, Ashworth CT. A study of particulate intestinal absorption and hepatocellular uptake. Use of polystyrene latex particles. *Experimental cell research* 1961;22:137-45.
- [10] Horowitz SM, Frondoza CG, Lennox DW. Effects of polymethylmethacrylate exposure upon macrophages. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1988;6:827-32.
- [11] Jepson MA, Simmons NL, Savidge TC, James PS, Hirst BH. Selective Binding and Transcytosis of Latex Microspheres by Rabbit Intestinal M-Cells. *Cell and tissue research* 1993;271:399-405.
- [12] Johnston HJ, Semmler-Behnke M, Brown DM, Kreyling W, Tran L, Stone V. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicology and applied pharmacology* 2010;242:66-78.
- [13] Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Mol Pharmaceut* 2004;1:77-84.

- [14] McClean S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z, et al. Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur J Pharm Sci* 1998;6:153-63.
- [15] Leroux JC, Gravel P, Balant L, Volet B, Anner BM, Allemann E, et al. Internalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by isolated human leukocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles. *J Biomed Mater Res* 1994;28:471-81.
- [16] Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000;18:301-13.
- [17] Tobio M, Gref R, Sanchez A, Langer R, Alonso MJ. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm Res* 1998;15:270-5.
- [18] Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2004;21:387-422.
- [19] Yu JJ, Lee HA, Kim JH, Kong WH, Kim Y, Cui ZY, et al. Bio-distribution and anti-tumor efficacy of PEG/PLA nano particles loaded doxorubicin. *Journal of Drug Targeting* 2007;15:279-84.
- [20] Borchard G, Kreuter J. The role of serum complement on the organ distribution of intravenously administered poly (methyl methacrylate) nanoparticles: Effects of pre-coating with plasma and with serum complement. *Pharm Res* 1996;13:1055-8.
- [21] Araujo L, Sheppard M, Lobenberg R, Kreuter J. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. *Int J Pharm* 1999;176:209-24.
- [22] Voltan R, Castaldello A, Brocca-Cofano E, Altavilla G, Caputo A, Laus M, et al. Preparation and characterization of innovative protein-coated Poly(Methylmethacrylate) core-shell nanoparticles for vaccine purposes. *Pharm Res* 2007;24:1870-82.
- [23] Xu H, Shi JX, Sun T. Polymethylmethacrylate-grafted titanium dioxide nanoparticles prepared via radical polymerization. *J Adv Mater-Covina* 2008;40:27-32.
- [24] Dhana Lekshmi UM, Poovi G, Kishore N, Reddy PN. In vitro characterization and invivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 2010;396:194-203.

- [25] 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.
- [26] Sauer R, Froimowicz P, Scholler K, Cramer JM, Ritz S, Mailander V, et al. Design, Synthesis, and Miniemulsion Polymerization of New Phosphonate Surfmers and Application Studies of the Resulting Nanoparticles as Model Systems for Biomimetic Mineralization and Cellular Uptake. *Chem-Eur J* 2012;18:5201-12.
- [27] Bhalgat MK, Haugland RP, Pollack JS, Swan S, Haugland RP. Green- and red-fluorescent nanospheres for the detection of cell surface receptors by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 1998;219:57-68.
- [28] Tronc F, Li M, Lu JP, Winnik MA, Kaul BL, Graciet JC. Fluorescent polymer particles by emulsion and miniemulsion polymerization. *J Polym Sci Pol Chem* 2003;41:766-78.
- [29] Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin - Review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:419-36.
- [30] Haag R, Kratz F. Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45:1198-215.
- [31] Abuchowski A, Vanes T, Palczuk NC, Davis FF. Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum-Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene-Glycol. *Journal of Biological Chemistry* 1977;252:3578-81.
- [32] Abuchowski A, Mccoy JR, Palczuk NC, Vanes T, Davis FF. Effect of Covalent Attachment of Polyethylene-Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. *Journal of Biological Chemistry* 1977;252:3582-6.
- [33] Ranney DF. Biomimetic transport and rational drug delivery. *Biochem Pharmacol* 2000;59:105-14.
- [34] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliver Rev* 2002;54:631-51.
- [35] Gbadamosi JK, Hunter AC, Moghimi SM. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *Febs Lett* 2002;532:338-44.
- [36] Sofia SJ, Premnath V, Merrill EW. Poly(ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: Grafting density and protein adsorption. *Macromolecules* 1998;31:5059-70.
- [37] Szeleifer I. Protein adsorption on tethered polymer layers: effect of polymer chain architecture and composition. *Physica A* 1997;244:370-88.

- [38] Yildiz U, Landfester K. Miniemulsion polymerization of styrene in the presence of macromonomeric initiators. *Polymer* 2008;49:4930-4.
- [39] Park K. Effect of shape and size of polymer particles on cellular internalization. *Journal of Controlled Release* 2010;147:313-.
- [40] Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater* 2009;8:15-23.
- [41] Doshi N, Mitragotri S. Designer Biomaterials for Nanomedicine. *Adv Funct Mater* 2009;19:3843-54.
- [42] Simone EA, Dziubla TD, Muzykantov VR. Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery. *Expert Opin Drug Del* 2008;5:1283-300.
- [43] Petersen S, Steiniger F, Fischer D, Fahr A, Bunjes H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:150-61.
- [44] Florez L, Herrmann C, Cramer JM, Hauser CP, Koynov K, Landfester K, et al. How Shape Influences Uptake: Interactions of Anisotropic Polymer Nanoparticles and Human Mesenchymal Stem Cells. *Small* 2012.
- [45] Staff RH, Lieberwirth I, Landfester K, Crespy D. Preparation and Characterization of Anisotropic Submicron Particles From Semicrystalline Polymers. *Macromol Chem Phys* 2012;213:351-8.
- [46] Hall Ca. Overton, C. E. 1901, *Studies of Narcosis*. Gustav Fischer Verlag 1991.
- [47] Hans Kleinig UM. *Zellbiologie*. 4. Ed. ed1999.
- [48] Helmut Plattner JH. *Taschenlehrbuch Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag 1997.
- [49] H. Lodish AB, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. E. Darnell. *Molekulare Zellbiologie* 2001.
- [50] Friedrich Lottspeich JWE. *Bioanalytik* 2006.
- [51] Sandermann H. *Membranbiochemie - Eine Einführung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo 1983.
- [52] Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720-31.
- [53] Cardelli J. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* 2001;2:311-20.
- [54] Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. *The Journal of general virology* 2002;83:1535-45.

- [55] Bareford LA, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2007;59:748-58.
- [56] Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews* 2012;41:2718-39.
- [57] Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:349-63.
- [58] Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 2000;1:31-9.
- [59] Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 2003;32:257-83.
- [60] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2007;8:603-12.
- [61] Kanaseki T, Kadota K. Vesicle in a Basket - a Morphological Study of Coated Vesicle Isolated from Nerve Endings of Guinea Pig Brain, with Special Reference to Mechanism of Membrane Movements. *Journal of Cell Biology* 1969;42:202-&.
- [62] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37-44.
- [63] Iversen TG, Skotland T, Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 2011;6:176-85.
- [64] 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.
- [65] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2873-96.
- [66] 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.
- [67] Lorenz S, Hauser CP, Autenrieth B, Weiss CK, Landfester K, Mailander V. The softer and more hydrophobic the better: influence of the side chain of polymethacrylate nanoparticles for cellular uptake. *Macromol Biosci* 2010;10:1034-42.
- [68] Kawaguchi H, Koiwai N, Ohtsuka Y, Miyamoto M, Sasakawa S. Phagocytosis of latex particles by leucocytes. I. Dependence of phagocytosis on the size and surface potential of particles. *Biomaterials* 1986;7:61-6.

- [69] Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res* 2008;25:1815-21.
- [70] Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of Polymer Microspheres by Macrophages. *Advances in Polymer Science* 1990;94:107-41.
- [71] Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. *Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size*. *Pharm Res* 1996;13:1838-45.
- [72] Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997;14:1568-73.
- [73] Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggard T, Donnelly SC, Cagney G, et al. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46:5754-6.
- [74] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *P Natl Acad Sci USA* 2008;105:14265-70.
- [75] Sharma G, Valenta DT, Altman Y, Harvey S, Xie H, Mitragotri S, et al. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Control Release* 2010;147:408-12.
- [76] Doshi N, Mitragotri S. Macrophages recognize size and shape of their targets. *PLoS One* 2010;5:e10051.
- [77] Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* 2007;2:249-55.
- [78] Champion JA, Mitragotri S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res* 2009;26:244-9.
- [79] Bender A, Schfer V, Steffan AM, Royer C, Kreuter J, Rubsamen-Waigmann H, et al. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles. *Research in virology* 1994;145:215-20.
- [80] Hsu CH, Cui Z, Mumper RJ, Jay M. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech* 2003;4:E32.
- [81] Koval M, Preiter K, Adles C, Stahl PD, Steinberg TH. Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. *Experimental cell research* 1998;242:265-73.
- [82] Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4930-4.

- [83] Lacasse FX, Filion MC, Phillips NC, Escher E, McMullen JN, Hildgen P. Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis. *Pharm Res* 1998;15:312-7.
- [84] Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 1988;9:356-62.
- [85] Zahr AS, Davis CA, Pishko MV. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol). *Langmuir* 2006;22:8178-85.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] Cserhati T, Forgacs E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment international* 2002;28:337-48.
- [89] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2050-5.
- [90] Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci* 2007;134-135:167-74.
- [91] Jiang X, Weise S, Hafner M, Rucker C, Zhang F, Parak WJ, et al. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2010;7 Suppl 1:S5-S13.
- [92] Rucker C, Potzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2009;4:577-80.
- [93] Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggard T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano* 2011;5:7503-9.
- [94] Lesniak A, Campbell A, Monopoli MP, Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 2010;31:9511-8.

- [95] Drescher D, Orts-Gil G, Laube G, Natte K, Veh RW, Osterle W, et al. Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:1367-73.
- [96] Baier G, Costa C, Zeller A, Baumann D, Sayer C, Araujo PH, et al. BSA adsorption on differently charged polystyrene nanoparticles using isothermal titration calorimetry and the influence on cellular uptake. *Macromol Biosci* 2011;11:628-38.
- [97] Lindman S, Lynch I, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-isopropylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett* 2007;7:914-20.
- [98] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliver Rev* 2009;61:428-37.
- [99] Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret JF. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:9353-63.
- [100] Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Protein-Nanoparticle Interactions What Does the Cell See? *Nat Nanotechnol* 2009;4:546-7.
- [101] Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer-Chemotherapy - Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res* 1986;46:6387-92.
- [102] Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1310-6.
- [103] Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods in molecular biology* 2010;624:25-37.
- [104] Hatakeyama H, Akita H, Ito E, Hayashi Y, Oishi M, Nagasaki Y, et al. Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Biomaterials* 2011;32:4306-16.
- [105] Kono K, Kojima C, Hayashi N, Nishisaka E, Kiura K, Watarai S, et al. Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin. *Biomaterials* 2008;29:1664-75.
- [106] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1261-77.

- [107] Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J* 2007;9:E128-47.
- [108] Lim HK, Asharani PV, Hande MP. Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient Mammalian cells. *Frontiers in genetics* 2012;3:104.
- [109] Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology* 2008;26:425-33.
- [110] Huang XL, Zhuang J, Teng X, Li LL, Chen D, Yan XY, et al. The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials* 2010;31:6142-53.
- [111] Tecan. Instructions for Use for Infinite M1000. Tecan Deutschland GmbH2008.
- [112] Rahman M. Introduction to Flow Cytometry. AbD SEROTECH 2006.
- [113] Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Carl Zeiss Mikroskopsysteme 2010.
- [114] 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-+.
- [115] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. Human Cell Line from a Pleural Effusion Derived from a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer I* 1973;51:1409-16.
- [116] Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci* 2007;95:300-12.
- [117] Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 2008;3:40-7.
- [118] Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci* 2007;100:303-15.
- [119] Bouchemal K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discov Today* 2008;13:960-72.
- [120] Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Muller RH. Functional groups on polystyrene model nanoparticles: Influence on protein adsorption. *J Biomed Mater Res A* 2003;65A:319-26.

[121] Pollitt MJ, Buckton G, Brocchini S, Alpar HO. Calorimetric study of bovine serum albumin dilution and adsorption onto polystyrene particles. *Int J Pharm* 2005;298:333-8.

[122] Landfester K, Holzappel V, Musyanovych A, 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.

[123] 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.

[124] Villanueva A, Canete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 2009;20.

[125] 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.

[126] 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.

[127] Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. IN-VITRO EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF DIEPOXY COMPOUNDS USED FOR BIOMATERIAL MODIFICATION. *J Biomed Mater Res* 1995;29:829-34.

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

[129] Chen Z, Lohr A, Saha-Moller CR, Wurthner F. Self-assembled pi-stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features. *Chem Soc Rev* 2009;38:564-84.

[130] Zhang J, Mumin AM, Barrett JW, Dekaban GA. Dendritic cell internalization of foam-structured fluorescent mesoporous silica nanoparticles. *J Colloid Interf Sci* 2011;353:156-62.

[131] 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* 2010;31:2064-71.

[132] Tautzenberger A, Kreja L, Zeller A, Lorenz S, Schrezenmeier H, Mailander V, et al. Direct and indirect effects of functionalised fluorescence-labelled

nanoparticles on human osteoclast formation and activity. *Biomaterials* 2011;32:1706-14.

[133] Duncan R, Kopecek J. Soluble Synthetic-Polymers as Potential-Drug Carriers. *Advances in Polymer Science* 1984;57:51-101.

[134] Duncan R. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anticancer Drugs* 1992;3:175-210.

[135] Kopecek J, Kopeckova P, Minko T, Lu ZR. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:61-81.

[136] Landfester K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:4488-507.

[137] Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: First member of a new class of chemotherapeutic agents - Drug-polymer conjugates. *Clinical Cancer Research* 1999;5:83-94.

[138] Barz M, Tarantola M, Fischer K, Schmidt M, Luxenhofer R, Janshoff A, et al. From defined reactive diblock copolymers to functional HPMA-based self-assembled nanoaggregates. *Biomacromolecules* 2008;9:3114-8.

[139] Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang XL, Chen CY, Zhao YL. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small* 2011;7:1322-37.

[140] Mailander V, Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules* 2009;10:2379-400.

[141] Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* 2010;6:12-21.

[142] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* 2006;6:662-8.

[143] Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes. *P Natl Acad Sci USA* 2007;104:11901-4.

[144] Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release* 2007;121:3-9.

[145] Herrmann C, Bannwarth MB, Landfester K, Crespy D. Re-dispersible Anisotropic and Structured Nanoparticles: Formation and Their Subsequent Shape Change. *Macromol Chem Physic* 2012;213:829-38.

- [146] Ho CC, Keller A, Odell JA, Ottewill RH. Preparation of Monodisperse Ellipsoidal Polystyrene Particles. *Colloid Polym Sci* 1993;271:469-79.
- [147] Mohraz A, Solomon MJ. Direct visualization of colloidal rod assembly by confocal microscopy. *Langmuir* 2005;21:5298-306.
- [148] Arnida, Janat-Amsbury MM, Ray A, Peterson CM, Ghandehari H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:417-23.
- [149] Meng H, Yang S, Li Z, Xia T, Chen J, Ji Z, et al. Aspect ratio determines the quantity of mesoporous silica nanoparticle uptake by a small GTPase-dependent macropinocytosis mechanism. *ACS Nano* 2011;5:4434-47.
- [150] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* 2004;377:159-69.
- [151] Moller J, Luehmann T, Hall H, Vogel V. The race to the pole: how high-aspect ratio shape and heterogeneous environments limit phagocytosis of filamentous *Escherichia coli* bacteria by macrophages. *Nano Lett* 2012;12:2901-5.
- [152] Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:302-10.
- [153] Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:247-59.
- [154] Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58.
- [155] Khang D, Lu J, Yao C, Haberstroh KM, Webster TJ. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials* 2008;29:970-83.
- [156] Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:129-38.
- [157] Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-32.

- [158] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 2001;22:87-96.
- [159] Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *J Anat* 1996;189 (Pt 3):503-5.
- [160] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Febs Lett* 1990;268:235-7.
- [161] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004;303:1818-22.
- [162] Thiele L, Diederichs JE, Reszka R, Merkle HP, Walter E. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* 2003;24:1409-18.
- [163] Absolom DR. Opsonins and dysopsonins: an overview. *Methods Enzymol* 1986;132:281-318.
- [164] Patel HM. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992;9:39-90.
- [165] Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suarez AI. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release* 2002;79:29-40.
- [166] Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 2005;298:315-22.
- [167] Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 2001;76:59-71.
- [168] Illum L, Jacobsen LO, Muller RH, Mak E, Davis SS. Surface Characteristics and the Interaction of Colloidal Particles with Mouse Peritoneal-Macrophages. *Biomaterials* 1987;8:113-7.
- [169] Allen TM, Chonn A. Large Unilamellar Liposomes with Low Uptake into the Reticuloendothelial System. *Febs Lett* 1987;223:42-6.
- [170] Messerschmidt SKE, Musyanovych A, Altvater M, Scheurich P, Pfizenmaier K, Landfester K, et al. Targeted lipid-coated nanoparticles: Delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells. *Journal of Controlled Release* 2009;137:69-77.

- [171] Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur J Pharmacol* 2011;670:372-83.
- [172] Harris JM. Introduction to biomedical and biotechnical applications of polyethylene glycol. *Abstr Pap Am Chem S* 1997;213:21-Poly.
- [173] Vyas SP, Singh A, Sihorkar V. Ligand-receptor-mediated drug delivery: an emerging paradigm in cellular drug targeting. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18:1-76.
- [174] Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:214-21.
- [175] Wattendorf U, Merkle HP. PEGylation as a Tool for the Biomedical Engineering of Surface Modified Microparticles. *J Pharm Sci-U.S.* 2008;97:4655-69.
- [176] Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003;42:463-78.
- [177] Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, Degennes PG. Protein Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide .1. Simplified Theory. *J Colloid Interf Sci* 1991;142:149-58.
- [178] Jeon SI, Andrade JD. Protein Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide .2. Effect of Protein Size. *J Colloid Interf Sci* 1991;142:159-66.
- [179] McPherson T, Kidane A, Szleifer I, Park K. Prevention of protein adsorption by tethered poly(ethylene oxide) layers: Experiments and single-chain mean-field analysis. *Langmuir* 1998;14:176-86.
- [180] Torchilin VP. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2549-59.
- [181] Bhadra D, Bhadra S, Jain P, Jain NK. Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie* 2002;57:5-29.
- [182] Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin Cancer Res* 2000;6:1949-57.
- [183] Park J, Fong PM, Lu J, Russell KS, Booth CJ, Saltzman WM, et al. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine* 2009;5:410-8.
- [184] Meng F, Engbers GH, Feijen J. Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:49-58.

- [185] Meng FH, Engbers GHM, Gessner A, Muller RH, Feijen J. Pegylated polystyrene particles as a model system for artificial cells. *J Biomed Mater Res A* 2004;70A:97-106.
- [186] Musyanovych A, Dausend J, Dass M, Walther P, Mailander V, Landfester K. Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: a study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomater* 2011;7:4160-8.
- [187] Sukhorukov G, Fery A, Mohwald H. Intelligent micro- and nanocapsules. *Prog Polym Sci* 2005;30:885-97.
- [188] De Geest BG, Sanders NN, Sukhorukov GB, Demeester J, De Smedt SC. Release mechanisms for polyelectrolyte capsules. *Chemical Society Reviews* 2007;36:636-49.
- [189] De Geest BG, Dejumat C, Sukhorukov GB, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J. Self-rupturing microcapsules. *Adv Mater* 2005;17:2357-+.
- [190] Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 1996;56:1194-8.
- [191] Ruggiero C, Pastorino L, Herrera OL. Nanotechnology based targeted drug delivery. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010;2010:3731-2.
- [192] Shu S, Zhang X, Wu Z, Wang Z, Li C. Gradient cross-linked biodegradable polyelectrolyte nanocapsules for intracellular protein drug delivery. *Biomaterials* 2010;31:6039-49.
- [193] Rong X, Xie Y, Hao X, Chen T, Wang Y, Liu Y. Applications of polymeric nanocapsules in field of drug delivery systems. *Current drug discovery technologies* 2011;8:173-87.
- [194] Cortez C, Tomaskovic-Crook E, Johnston APR, Radt B, Cody SH, Scott AM, et al. Targeting and uptake of multilayered particles to colorectal cancer cells. *Adv Mater* 2006;18:1998-+.
- [195] Sakai H, Sekita A, Tanaka K, Sakai K, Kondo T, Abe M. Preparation and properties of nanosized biodegradable polymer capsules. *J Oleo Sci* 2011;60:569-73.
- [196] Baier G, Musyanovych A, Landfester K, Best A, Lorenz S, Mailander V. DNA amplification via polymerase chain reaction inside miniemulsion droplets with subsequent poly(n-butylcyanoacrylate) shell formation and delivery of polymeric capsules into mammalian cells. *Macromol Biosci* 2011;11:1099-109.
- [197] Bertin A, Hermes F, Schlaad H. Biohybrid and Peptide-Based Polymer Vesicles. *Polymer Membranes/Biomembranes* 2010;224:167-95.

- [198] Rivera-Gil P, De Koker S, De Geest BG, Parak WJ. Intracellular processing of proteins mediated by biodegradable polyelectrolyte capsules. *Nano Lett* 2009;9:4398-402.
- [199] Mosqueira VC, Legrand P, Gref R, Heurtault B, Appel M, Barratt G. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *J Drug Target* 1999;7:65-78.
- [200] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998;15:1326-31.
- [201] Santander-Ortega MJ, Lozano-Lopez MV, Bastos-Gonzalez D, Peula-Garcia JM, Ortega-Vinuesa JL. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. *Colloid Polym Sci* 2010;288:159-72.
- [202] Pan PJ, Fujita M, Ooi WY, Sudesh K, Takarada T, Goto A, et al. DNA-functionalized thermoresponsive bioconjugates synthesized via ATRP and click chemistry. *Polymer* 2011;52:895-900.
- [203] Chhabra R, Sharma J, Liu Y, Rinker S, Yan H. DNA self-assembly for nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:617-25.
- [204] Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol* 1982;99:237-47.
- [205] Javier AM, Kreft O, Semmling M, Kempter S, Skirtach AG, Bruns OT, et al. Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells. *Adv Mater* 2008;20:4281-7.
- [206] Kirchner C, Javier AM, Susha AS, Rogach AL, Kreft O, Sukhorukov GB, et al. Cytotoxicity of nanoparticle-loaded polymer capsules. *Talanta* 2005;67:486-91.
- [207] Cryan SA. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *AAPS J* 2005;7:E20-41.
- [208] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:637-51.
- [209] George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release* 2006;114:1-14.
- [210] Lin YH, Chang CH, Wu YS, Hsu YM, Chiou SF, Chen YJ. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials* 2009;30:3332-42.

[211] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release* 2008;126:187-204.

[212] Aboubakar M, Couvreur P, Pinto-Alphandary H, Gouritin B, Lacour B, Farinotti R, et al. Insulin-loaded nanocapsules for oral administration: In vitro and in vivo investigation. *Drug Develop Res* 2000;49:109-17.

11 Danksagung

12 Lebenslauf

13 Veröffentlichungen

14 Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2009 bis September 2012 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz bei (...) in der Arbeitsgruppe von (...) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn gemäß anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Mainz, den 29.11.2012

(Jens-Michael Cramer)