



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ



# Masterarbeit

## **Aufnahme und intrazelluläres Trafficking von Nanocarriern in immaturren dendritischen Zellen**

Eingereicht am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

Ulrike Kintzel

1. Gutachter: PD Dr. med. Volker Mailänder  
2. Gutachter: PD Dr. Joachim Urban  
vorgelegt am: 26. 01. 2016

## Zusammenfassung

Die Anlagerung von Serumproteinen mit Opsonincharakter wie IgG an der Oberfläche von Nanocarriern (NC) unterstützt deren Identifizierung und Aufnahme durch phagozytierende Zellen des Immunsystems (z.B. iDCs, immature dendritische Zellen) und infolge dessen die Entfernung der Carrier aus dem Blutkreislauf. Mit P(EtPPn) wurde in diesem Zusammenhang eine bioabbaubare Alternative zu PEG, welches die Anlagerung einer sogenannten Proteinkorona vermindert, untersucht. Die Modifizierung von Polystyrolpartikeln mit P(EtPPn) führte hierbei zu einer stark verringerten Aufnahme durch iDCs in Anwesenheit von 100% Humanserum (HS) *in vitro*, wobei die Effizienz mit der von PEG vergleichbar ist. Die Analyse der Proteinkorona zeigte, dass humanes IgG vermindert an die beiden modifizierten Partikel bindet. Dennoch bewirkte eine Vorinkubation mit IgG reduziertem Plasma keine signifikante Veränderung auf die Aufnahme in iDCs. Die genauere Funktionsweise von P(EtPPn) muss noch genauer untersucht werden, jedoch weist P(EtPPn) ein ähnliches Verhalten wie PEG hinsichtlich der Proteinkorona und der Aufnahme in iDCs auf. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die bioabbaubare Modifikation vielversprechend für *in vivo* Anwendungen ist.

Wie oben beschrieben ist es wichtig, dass die NC die Zielzellen in ausreichender Konzentration erreichen. Ebenso wichtig ist das Schicksal des NCs innerhalb einer Zelle, da der Abbau oder das aktive Ausschleusen des beladenen Wirkstoffs aus der Zelle gravierenden Einfluss auf die Wirksamkeit einer Therapie haben kann. Ziel ist es daher eine einfache und quantitativ anwendbare Methode unter Verwendung des Durchflusszytometers zu validieren, die den intrazellulären Transport der Vesikel mittels Markerproteine nachverfolgen kann. Über magnetische Partikel konnte eine große Menge an Vesikeln aufgereinigt werden, jedoch zeigten die für die Aufreinigung verwendeten  $\mu$ MACS Säulen Einfluss auf die Gestalt der NCs im Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Eine Alternative zu den magnetischen Partikeln sind magnetische Beads, die spezifisch an die Markerproteine binden können. Durch die Verwendung von HS (9 und 33%) konnte die Spezifität der Bindungen erhöht werden. Hierbei zeigte sich jedoch bei der 33% HS Probe eine geringere Kolo-kalisation mit EEA1 (ein Rab5 Effektorprotein) als bei 9% HS. Durch eine abschließende Validierung dieser Methode, bei welcher keine Transfektionen notwendig sind, sollte es möglich werden das zelluläre Schicksal der Nanopartikel und damit des Wirkstoffes zu identifizieren.

## Abstract

The binding of opsonins such as IgG to the surface of the nanocarriers supports their identification and uptake by phagocytic cells of the immune system (for example immature dendritic cells) and consequently the removal of the carrier from the bloodstream. In this context, P(EtPPn) a biodegradable alternative to PEG which reduces the addition of the so-called protein corona, was investigated. In the presence of serum proteins the modification of polystyrene particles with P(EtPPn) resulted in a greatly reduced uptake by immature dendritic cells *in vitro*, whereby the efficiency is comparable with PEG. The Analysis of the protein corona showed that the binding of human IgG to the two modified particles is reduced. However, there was no significant difference to the uptake by immature dendritic cells after a pre-incubation with IgG reduced plasma. The mechanism of P(EtPPn) needs to be examined more closely, nevertheless, P(EtPPn) shows a behavior similar to PEG with respect to the protein corona and the uptake by immature dendritic cells. This is a strong indication that this biodegradable modification is a promising candidate for applications *in vivo*.

As described above, it is important that the carriers reach the target cell in sufficient concentration. Equally important is the fate of the nanocarriers within a cell, as the degradation or the active transfer of the loaded drug to the outside of the cell may have a wide influence on the efficiency of a therapy. The aim is therefore to validate a simple and quantitatively applicable method for the flow cytometry, which can trace the intracellular transport of vesicles with marker proteins. A high amount of vesicles could be purified via magnetic particles, but the  $\mu$ MACS columns used for the purification showed an effect on the shape of the nanoparticles in transmission electron microscope (TEM). An alternative to the magnetic particles are magnetic beads, which can specifically bind to the marker proteins. By the use of human serum (9 or 33%) the specificity of the binding could be increased. Here, the 33% sample showed less colocalization with EEA1 (a Rab5 effector protein) than the 9% one. By a final validation of this method, in which no transfections are necessary, it should be possible to identify the cellular fate of nanoparticles and the active agent.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abbildungsverzeichnis .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Nanocarrier .....	1
1.1.1 Harte und weiche Proteinkorona von Nanocarriern .....	2
1.1.2 Nanopartikel und die Notwendigkeit diese zu tarnen.....	2
1.1.3 Magnetische PS-Nanopartikel .....	3
1.1.3.1 Synthese magnetischer PS-Nanopartikel.....	4
1.1.3.2 Modifizierung der Oberfläche von PS-Nanopartikel mit Antikörpern.....	4
1.2 Zelluläre Aufnahmemechanismen .....	6
1.3 Intrazellulärer Transport .....	7
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden .....	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Zelllinien und primäre Zellen .....	9
2.1.2 Medien und Zusätze.....	9
2.1.3 Nanocarrier .....	10
2.1.4. Antikörper.....	10
2.1.5 Chemikalien.....	11
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.7 Geräte.....	13
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 Generierung dendritischer Zellen aus Buffy-Coat.....	14
2.2.2 Zellkultur .....	15
2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	15
2.2.3 Aggregationstest am Fluoreszenzmikroskop.....	16
2.2.4 Durchflusszytometrie.....	16
2.2.4.1 Zytotoxizitätstest.....	17
2.2.4.2 Detektion der Nanocarrierbindung .....	17
2.2.4.3 Vorinkubation der Partikel mit IgG reduziertem Plasma .....	17
2.2.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	18

2.2.5.1	Detektion der NanocARRIERAUFNAHME in IDCs mittels cLSM .....	18
2.2.5.2	Detektion der Antikörperfunktionalisierung von NanocARRIERN.	19
2.2.6	Aufreinigung der harten ProteinkORONA von NanocARRIERN .....	19
2.2.6.1	Pierce Assay.....	19
2.2.6.2	SDS-PAGE .....	20
2.2.6.3	Comassie Färbung .....	20
2.2.6.4	Western Blot .....	20
2.2.6.5	Oberflächenberechnung .....	21
2.2.7	VesikelAUFREINIGUNG über $\mu$ MACS-SÄULEN.....	21
2.2.7.1	$\mu$ MACS und magnetische NanocARRIER.....	22
2.2.7.2	PS-COOH enthaltende Vesikel im TEM.....	23
2.2.7.3	$\mu$ MACS und Anti-Maus IgG MicroBeads.....	23
3	Ergebnisse .....	25
3.1	Polystyrolpartikel mit <i>Stealth</i> -Effekt .....	25
3.1.1	P(EtPPn) Funktionalisierung verringert Zytotoxizität.....	25
3.1.2	Aufnahme der PS-Partikel in IDCs.....	26
3.1.3	Die Oberflächenfunktionalisierung bestimmt die Zusammensetzung der ProteinkORONA.....	28
3.1.4	Einfluss von IgG auf die Aufnahme .....	30
3.2	Intrazellulärer Transport der NanocARRIER .....	31
3.2.1	Polystyrolpartikel mit Eisenoxid .....	31
3.2.1.1	Nachweis der Oberflächenmarkierung .....	32
3.2.1.2	PS-COOH enthaltende Vesikel.....	33
3.2.1.3	Nachweis der Vesikelmembran mit CellMask™ Orange.....	34
3.2.1.4	Nachweis der Unversehrtheit der Vesikelmembran mittels Antikörper.....	35
3.2.1.5	PS-COOH enthaltende Vesikel im TEM.....	37
3.2.2	Kopplung der Vesikel an magnetische Beads .....	38
3.2.2.1	Verringerung der unspezifischen Bindung über eine Vorinkubation der magnetischen Beads mit HS.....	38
3.2.2.2	Rab5A-GFP kolokalisiert mit EEA1 .....	40
4	Diskussion.....	42
4.1	Polystyrolpartikel mit <i>Stealth</i> -Effekt .....	42
4.1.1	Verringerung der Zytotoxizität von PS-Partikeln durch die Funktionalisierung mit P(EtPPn).....	42
4.1.2	Modifikation der PS-Partikel mit P(EtPPn) bewirkt <i>Stealth</i> - Effekt .....	43
4.1.3	ProteinkORONA der PS-Partikel mit P(EtPPn) .....	43
4.2	Magnetische NP enthaltende Vesikel und deren Aufreinigung über $\mu$ MACS.....	44
4.2.1	Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung .....	45
4.2.2	Nachweis der Vesikelmembran und deren Unversehrtheit.....	45

---

4.2.3	Modifizierung mit CD63 zeigt Aufnahme verbessernden Effekt	47
4.3	Vesikelaufreinigung mit Hilfe magnetischer Beads .....	47
4.3.1	Unspezifische Bindungen verhindern eine ausreichende Aufreinigung der Vesikel .....	48
4.3.2	Kolokalisation von Rab5A-GFP und EEA1 .....	48
5	Fazit und Ausblick .....	49
6	Danksagungen .....	51
	Literaturverzeichnis .....	52
	Eidesstattliche Erklärung .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ApoA4/C3/H	Apolipoprotein A4/C3/H
Arf6	Adenosyl-Ribosylierungsfaktor 6
BODIPY	Bor-dipyrrromethen
BSA	Rinderalbumin
CBB	Comassie Brilliant Blau
CCV	Clathrin überzogenen Vesikel
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CLIC	Clathrin unabhängige Carrier
cLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose
CTMA-Cl	Cetyltrimethylammonium Chlorid
DC	Dendritische Zellen
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Formaldehyd
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein
GMCSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HS	Humanes Serum
iDC:	Immature dendritische Zellen
IgG HC/LC	Immunglobulin G schwere Kette / leichte Kette
IL4	Interleukin 4
MACS	Magnetische Zellsortierung – <i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
MPIP	Max-Planck-Institut für Polymerforschung
MPS	Mononukleär-phagozytäre System
NC	Nanocarrier
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP	Nanopartikel
P(EtPPn)	Polyethylphosphonat
PBMC:	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol

---

PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PS	Polystyrol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreulich
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VE	vollentsalzt



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien und primäre Zellen .....	9
Tabelle 2: Medium und Zusätze .....	9
Tabelle 3: Nanocarrier .....	10
Tabelle 4: Antikörper.....	10
Tabelle 5: Chemikalien.....	11
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 7: Geräte .....	13

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung magnetischer PS-Partikel. ....	4
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Modifizierung der magnetischen PS- Partikel mit Antikörpern. ....	5
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der Endozytose. ....	7
<b>Abbildung 4:</b> Zytotoxizitätstest der aminofunktionalisierten PS-Nanopartikel. ....	26
<b>Abbildung 5:</b> Aufnahme und <i>Stealth</i> -Effekt von PS-NH <sub>2</sub> -P(EtPPn) <sub>46</sub> bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen. ....	27
<b>Abbildung 6:</b> Unterschiede in der Zusammensetzung der harten Proteinkorona bei aminofunktionalisierten PS-Partikel. ....	29
<b>Abbildung 7:</b> Einfluss von IgG auf die Nanocarrier Aufnahme. ....	30
<b>Abbildung 8:</b> Nachweis von Antikörpern an der Oberfläche magnetischer PS-Partikel.. .....	32
<b>Abbildung 9:</b> PS-COOH enthaltende Vesikel im Durchflusszytometer. ....	34
<b>Abbildung 10:</b> Nachweis der Vesikelmembran nach magnetischer Aufreinigung über μMACS. ....	35
<b>Abbildung 11:</b> Untersuchung der Unversehrtheit der Vesikelmembran nach magnetischer Aufreinigung über μMACS. ....	36
<b>Abbildung 12:</b> PS-COOH nach magnetischer Aufreinigung über μMACS im TEM. ....	37
<b>Abbildung 13:</b> Reduzierung der unspezifischen Bindung über die Vorinkubation der Beads mit HS. ....	39
<b>Abbildung 14:</b> Kolokalisation von Rab5A-GFP und EEA1. ....	41

# 1 Einleitung

## 1.1 Nanocarrier

Nanomaterialien sind längst ein fester Bestandteil in unserem Alltag, man findet sie in Wandfarben, in Kleidung und als Zusatz in Lebensmitteln oder Kosmetikprodukten. Auch in der Medizin stehen Nanotechnologien aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, sowohl in der Diagnostik, als auch in der Therapie im Mittelpunkt (Prasad 2009). Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung dieser als Transfersystem für Medikamente, wobei der eingesetzte Nanocarrier die Effizienz der Therapeutika erhöhen und deren Nebenwirkungen vermindern soll (Natarajan, Nugraha et al. 2014, Wang, Li et al. 2014). Die Partikel können hierbei genutzt werden um einerseits empfindliche Medikamente, Peptide und Biomoleküle wie siRNA vor einem frühzeitigen Abbau zu schützen. Andererseits können für den Organismus toxische Substanzen bis zum Erreichen des Zielgewebes abgeschirmt und somit negative Effekte auf gesunde Zellen minimiert werden. Über verschiedene Oberflächenmodifikationen bieten Nanocarrier zusätzlich die Möglichkeit eines spezifischen Targetings, wodurch Substanzen in einem bestimmten Gewebe angereichert und somit die Effizienz des Wirkstoffs erhöht werden kann (Mailander and Landfester 2009). Caelyx<sup>®</sup>, Mycet<sup>®</sup> oder Doxil<sup>®</sup> sind Beispiele für bereits zugelassene Medikamente, welche auf Nanotechnologien beruhen. Es handelt sich hierbei um mit Doxorubicin beladene Liposomen, wobei das Einkapseln des Chemotherapeutikums dessen dosislimitierende Kardiotoxizität verringert und im Falle von Doxil<sup>®</sup> über eine PEGylierung auch eine verlängerte Zirkulationszeit erreicht werden konnte (Herman, Rahman et al. 1983, Gabizon, Catane et al. 1994, Gabizon, Shmeeda et al. 2003).

Nanocarrier werden oft als solide, kolloidale Partikel in der Größenordnung von 10-1000 nm definiert (Mohanraj and Chen 2007, Rao and Geckeler 2011). Hierbei wird zwischen Nanopartikeln und Nanokapseln unterschieden. Nanokapseln sind vesikuläre Systeme, also Hohlkugeln aus einem festen Hüllenmaterial, welches einen flüssigen Kern aus Wasser oder Öl umschließt und so die Einkapselung von verschiedenen hydrophilen beziehungsweise hydrophoben Substanzen ermöglicht. Partikel hingegen sind solide Vollkörper (Rao and Geckeler 2011). Moleküle können an der Oberfläche von Nanocarriern kovalent gebunden beziehungsweise adsorbiert werden, oder in der poly-

meren Matrix verankert sein. Die Generierung der Carrier erfolgt entweder aus einem vorsynthetisierten Polymer, oder direkt aus dem Monomer (Rao and Geckeler 2011), zum Beispiel über eine direkte Polymerisation mittels Miniemulsion (Landfester 2009). Bei der Miniemulsion entsteht unter hohem Druck, beziehungsweise unter Verwendung von Ultraschall, aus zwei nicht mischbaren Phasen kleine, stabile „Nanotröpfchen“ in einer kontinuierlichen Phase. Die Stabilität der Tröpfchen wird über eine amphiphile Komponente, dem Tensid, und einem Co-Stabilisator gewährleistet. Der Co-Stabilisator, auch osmotisches Reagenz genannt, bewirkt aufgrund einer geringeren Löslichkeit in der kontinuierlichen Phase einen osmotischen Druck innerhalb der Tröpfchen (Landfester 2009).

### 1.1.1 Harte und weiche Proteinkorona von Nanocarriern

Werden NC in den Blutkreislauf eines Organismus injiziert, kommt es direkt zur Anlagerung von Proteinen an deren Oberfläche und zur Ausbildung einer Proteinkorona. Die Proteinkorona wird in zwei Schichten unterteilt: einer inneren konstanten Schicht, der sogenannten harten Korona und einer äußeren dynamischen weichen Korona. (Cedervall, Lynch et al. 2007, Lundqvist, Stigler et al. 2008, Walczyk, Bombelli et al. 2010). Es wird angenommen, dass die Proteine der harten Korona direkt mit der NC Oberfläche interagieren, während die weiche Proteinkorona nur schwach über Protein-Protein Interaktion mit der harten Korona verknüpft ist. Infolge dessen verbleibt die harte Korona auch nach der Aufnahme in die Zelle über Endozytose, oder nach der Translokation in eine andere physiologische Umgebung, am Partikel adsorbiert, wohingegen die weiche Korona verloren geht (Walkey and Chan 2012).

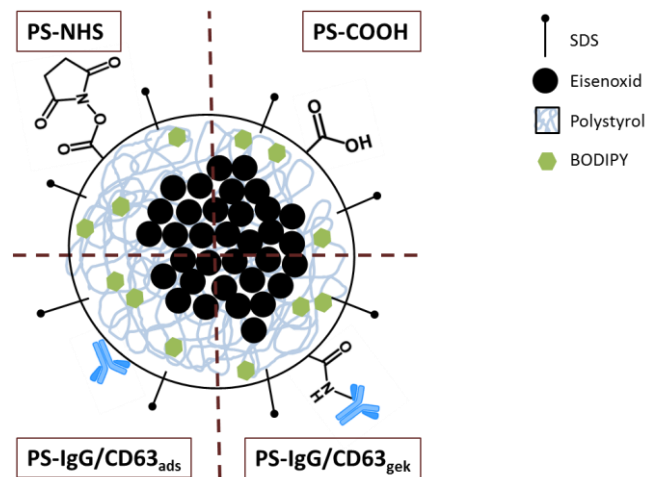
### 1.1.2 Nanopartikel und die Notwendigkeit diese zu tarnen

Die Proteinkorona beeinflusst maßgeblich die Eigenschaften der Partikel und deren Interaktion mit Ihrer Umgebung (Tenzer, Docter et al. 2013). Hierbei hängt die Proteinadsorption von der Oberflächenbeschaffenheit der NP ab und führt zu einer Veränderung der Größe, der elektrischen Ladung und der Oberflächenfunktionalisierung und hat somit einen großen Einfluss auf die Interaktion zwischen Partikeln und Zellen (Lundqvist, Stigler et al. 2008, Ehrenberg, Friedman et al. 2009, Guarnieri, Guaccio et al. 2011, Lesniak, Fenaroli et al. 2012). Es gibt bereits verschiedene Strategien um über eine Oberflächenfunktionalisierung die unspezifische Proteinadsorption zu reduzieren und

infolge dessen auch die Interaktion zwischen Partikeln und Zellen besser beeinflussen zu können (Owens and Peppas 2006, Runa, Hill et al. 2014). Wobei der von Owens und Peppas beschriebenen Effekt der Opsonisierung und der darauf folgenden Erkennung und Aufnahme der Partikel durch phagozytierende Zellen des Immunsystems eine zentrale Rolle spielt. Als Opsonine werden Proteine bezeichnet, welche die Anhaftung der phagozytierenden Zellen an körperfremde Zellen oder Partikeln erleichtern indem sie sich an die Zielstruktur anlagern und somit markieren (Winkelstein 1973). Die Tarnung gilt demnach besonders dem körpereigenen Immunsystem, welches die Halbwertszeit ungetarnter Partikel im Blutkreislauf enorm dezimiert und statt der Anreicherung im Zielgewebe deren Anreicherung in Leber und Milz zur Folge hat (Illum, Davis et al. 1987, Owens and Peppas 2006, Gref, Domb et al. 2012). Eine Methode um den *Stealth*-Effekt zu erreichen, ist die Modifizierung der NC Oberfläche mit PEG. Diese sogenannte „PEGylierung“ ist derzeit auch die gebräuchlichste Form einer solchen Funktionalisierung (Owens and Peppas 2006), jedoch aufgrund fehlender Bioabbaubarkeit nicht optimal für klinische Anwendungen geeignet. Aus diesem Grund ist die Etablierung bioabbaubare Alternativen, wie Polyphosphonate, ein wichtiger Teil der aktuellen Forschung (Wolf, Steinbach et al. 2015) und daher ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.3 Magnetische PS-Nanopartikel

Über die Einbettung von Eisenoxid-NP in eine PS-Matrix ist es möglich Partikel mit superparamagnetischen Eigenschaften zu synthetisieren (Ramirez and Landfester 2003). In einem magnetischen Feld sind solche Partikel befähigt mit benachbarten Partikeln zu interagieren und sich in einheitlicher Orientierung zusammenzufügen (Bannwarth, Kazer et al. 2013). Die magnetische Eigenschaft geht hierbei bei der Entfernung des magnetischen Feldes verloren und ist somit induzierbar. Eisenoxid-NP werden bereits zur Zellseparation, Organellisolation (Mitochondrien) oder auch als Kontrastmittel bei der Kernspintomografie verwendet (Saiyed, Telang et al. 2003, Antonelli, Sfara et al. 2013, Franko, Baris et al. 2013). Durch die Einbettung der Eisenoxid-NP in eine PS-Matrix addieren sich die magnetischen Eigenschaften zu der Möglichkeit der Oberflächenfunktionalisierung von PS-Partikeln (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung magnetischer PS-Partikel.** Im Rahmen dieser Arbeit wurden magnetische PS-Partikel mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen verwendet.

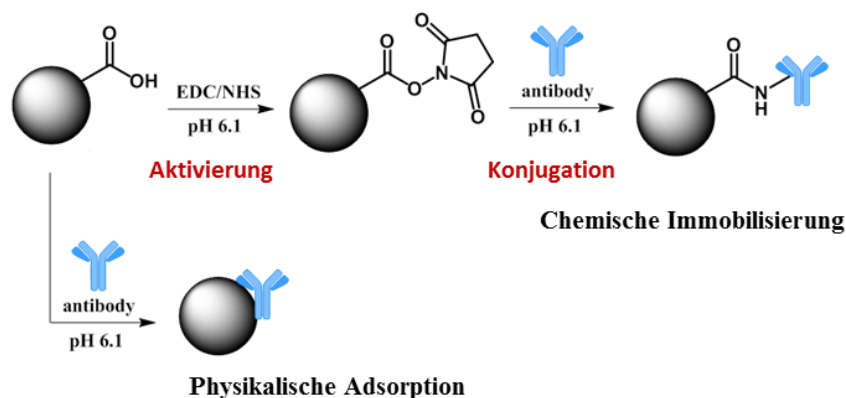
### 1.1.3.1 Synthese magnetischer PS-Nanopartikel

Die Synthese der magnetischen PS-Nanopartikeln erfolgt über mehrere Stufen (Bannwarth, Utech et al. 2015), wobei zunächst die Eisenoxid-NP synthetisiert werden (Bannwarth, Weidner et al. 2014). Separat von den Eisenoxid-NP erfolgt die Herstellung einer Miniemulsion aus Styrol (Monomer), n-Hexadekan (osmotische Reagenz) und SDS (Tensid) mittels Ultraschallstab. SDS und n-Hexadekan gewährleisten die Stabilität der entstehenden Nanotröpfchen. Über die Vermischung beider Dispersionen bei 80°C unter Zugabe von Kaliumpersulfat (Initiator) erfolgt dann die Einbettung des Eisenoxids in die PS-Matrix des NPs. Der Initiator wird hierbei zur Bildung von Radikalen und somit als Startpunkt und zur Aufrechterhaltung der Polymerisationsreaktion benötigt. Die Einbringung eines Fluoreszenzfarbstoffs wie BODIPY in das Polymer ( $\lambda_{\text{ex}}523 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}536 \text{ nm}$ ) ermöglicht zusätzlich die Detektion der Partikel beispielsweise mittels cLSM und Durchflusszytometrie. Die entstandenen PS-Partikel werden hinsichtlich ihrer Dispersität, Feststoffgehalt, Größe und zeta Potentials mittels DLS, Gefrier-trocknung und TEM charakterisiert (Bannwarth, Utech et al. 2015).

### 1.1.3.2 Modifizierung der Oberfläche von PS-Nanopartikel mit Antikörpern

Innerhalb dieser Masterarbeit wurden magnetische Polystyrolpartikel (PS-COOH) verwendet, welche an der Oberfläche mit Carboxylgruppen modifiziert worden waren. Durch die Adsorption bzw. über die kovalente Bindung von anti CD63 oder Maus IgG (als Isotypkontrolle) wurde hierbei die Carboxy-Funktionalisierung ersetzt (Abbildung

1). Da die adsorbierten Antikörper von Serumproteinen verdrängt werden, oder bei der Aufnahme der Partikel in die Zelle verloren gehen könnten, dient das kovalent gebundene Pendant als Positivkontrolle. Die kovalente Bindung zwischen der Carboxylgruppe des Partikels und der Aminogruppe des Antikörpers wird hierbei über einen zweistufigen Prozess erreicht, der sogenannten EDC/NHS-Kopplung (Abbildung 2). Bei dieser Methode wird zunächst die Carboxylgruppe mittels EDC aktiviert, wodurch diese befähigt ist mit Primären Aminen zu reagieren. NHS dient zur Stabilisierung des reaktiven Intermediats in der wässrigen Lösung (Fischer 2010). Für die Adsorption an der Oberfläche werden die Partikel lediglich 4 h lang mit den Antikörpern inkubiert.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Modifizierung der magnetischen PS-Partikel mit Antikörpern.** Modifiziert nach Diego Estupinan (MPIP, unveröffentlichte Daten).

Bei Tetraspaninen wie CD63 wird vermutet, dass sie bei der Antigenprozessierung und –präsentation in iDCs eine wichtige Rolle spielen (Mantegazza, Barrio et al. 2004). CD63 ist hauptsächlich im Zellinneren von iDCs angereichert, wobei MHC-II Moleküle in Endo- und Lysosomen vorwiegend mit CD63 assoziiert sind. An der Zelloberfläche hingegen bilden andere Tetraspanine Komplexe mit MHC-II Molekülen und CD63 macht eher einen geringen Anteil aus (Engering and Pieters 2001, Pols and Klumperman 2009). Die Lokalisierung von CD63 lässt vermuten, dass der Transport der Interaktionspartner reguliert, oder vielleicht auch der Abbau der MHC-II Proteine verhindert wird (Engering and Pieters 2001, Pols and Klumperman 2009). Auf jeden Fall sind Tetraspanine eine vielversprechende Möglichkeit um über die Funktionalisierung von Nanocarriern Einfluss auf deren Aufnahme in iDCs und auf die Bildung von MHC-II Komplexen und somit auf die Programmierung des Immunsystems zu nehmen. So wäre über eine Kolo-kalisation von MHC-II Komplexen und Nanocarriern, welche mit extrazellulären Proteinen von Pathogenen oder auch Krebszellen beladen wurden,

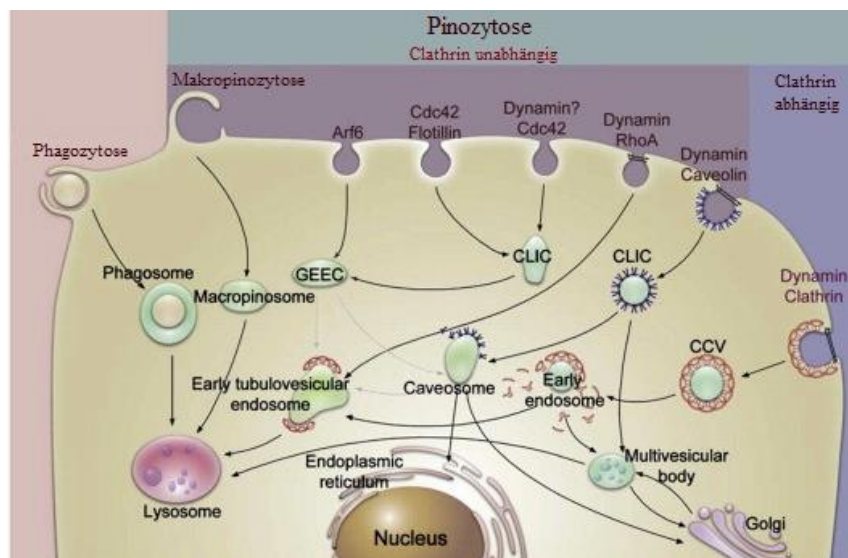
eine gezielte Präsentation von Antigenen an der Oberfläche von iDCs denkbar. Und infolge dessen auch eine gezielte Aktivierung von Immunzellen möglich.

## 1.2 Zelluläre Aufnahmemechanismen

Die Aufnahme von extrazellulären Substanzen, Nahrungsteilchen und Makromoleküle, und letztendlich auch von NCs in die Zelle erfolgt in der Regel über endozytotische Transportvesikel, welche von der Plasmamembran abgeschnürt werden (Conner and Schmid 2003). Wobei die Beschreibung der Endozytose als Aufnahmemechanismus nicht die ganze Bedeutung für die Zelle erfasst, so spielt sie auch eine regulatorische Schlüsselrolle in Prozessen wie Antigenpräsentation und Signaltransduktion und ermöglicht so der Zelle mit ihrer Umgebung zu interagieren (Doherty and McMahon 2009). Jedoch sind die unterliegenden Mechanismen für die Rekrutierung an der Membran und der Internalisierung noch nicht vollständig verstanden und müssen weiterhin erforscht und charakterisiert werden. CME ist der am besten untersuchte Endozytoseweg (Ford, Mills et al. 2002, Sorkin 2004). Hierbei bilden sich durch die Zusammenlagerung von Clathrin Molekülen an bestimmten Regionen der Plasmamembran sogenannte `clathrin-coated pits` über welche der Cargo internalisiert wird (Ferreira, Foley et al. 2012). Nach dem Einstülpungsprozess kommt es zur Dynamin vermittelten Abschnürung der `clathrin-coated pits` und zur Ausbildung von Clathrin überzogenen Vesikeln (Merrifield, Feldman et al. 2002). Andere Clathrin unabhängige Mechanismen wären beispielsweise die Caveolin-abhängige Endozytose, Arf6 vermittelte Endozytose, oder Makropinozytose (Doherty and McMahon 2009). Caveolea sind Caveolin umschlossene Einstülpungen der Plasmamembran, welche reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und wie bei der Clathrin-abhängigen Endozytose kommt es nach der Internalisierung zu Abschnürung mittels Dynamin (Le, Guay et al. 2002). Aktiviertes Arf6-GTP vermittelt an der Zelloberfläche die Internalisierung von Liganden und ist somit auch in endozytotische Aufnahmeprozesse involviert (Schweitzer, Sedgwick et al. 2011). Die Aktin abhängige Makropinozytose hingegen ist eine nicht selektive Form der Endozytose zur Internalisierung größerer Flüssigkeitsvolumina und extrazellulären Molekülen. Charakteristisch ist die Ausbildung von langen Membranausstülpungen, welche mit der Plasmamembran fusionieren und somit größere Mengen an extrazellulärem Material einschließen (Lim and Gleeson 2011). Welche dieser Routen (Abbildung 3) der NC letztendlich einschlägt hängt von mehreren Faktoren ab. So spielt die Größe, die Form,



die Ladung, die Oberflächenbeschaffenheit und auch die materielle Zusammensetzung des Carriers, sowie der verwendete Zelltyp eine entscheidende Rolle. Hinzu kommt die variierende Zusammensetzung der Proteinkorona der Carrier, welche wiederum maßgeblich entscheidend für die Interaktion mit der Zelle ist (Lundqvist, Stigler et al. 2008, Ehrenberg, Friedman et al. 2009, Guarnieri, Guaccio et al. 2011, Lesniak, Fenaroli et al. 2012). Auch Partikel, welche mit spezifischen Liganden funktionalisiert werden, müssen nicht zwangsläufig über den gleichen Mechanismus internalisiert werden wie der Ligand selbst (Sahay, Alakhova et al. 2010). Jeder NC und auch jede neue Funktionalisierung muss demnach im entsprechenden Zelltyp auf den bevorzugten Aufnahmemechanismus hin untersucht werden. Erst dann kann über das Design des Carriers Einfluss auf dessen Schicksal innerhalb eines biologischen Systems genommen werden.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der Endozytose.** CCV, Clathrin überzogenes Vesikel, CLIC, Clathrin unabhängige Carrier; GEEC, GPI-verankertes Protein angereichertes Kompartiment; GPI, Glycophosphatidylinositol. Modifiziert nach Sahay et al. (Sahay, Alakhova et al. 2010).

### 1.3 Intrazellulärer Transport

Nachdem der NC in die Zelle aufgenommen wurde, muss dessen intrazelluläre Verteilung untersucht werden, da das zelluläre Schicksal des Carriers in direktem Zusammenhang mit dessen Zytotoxizität und medizinischer Wirkung steht (Zhao, Zhao et al. 2011). Der Transport über endozytotische Vesikel verläuft z.B. über frühe und späte Endosomen bis hin zum Abbau des internalisierten Materials in Lysosomen. Es kann auch zum Rücktransport über Recyclingendosomen zur Plasmamembran oder zum Golgiapparat (Tokarev, Alfonso et al. 2009), sowie zum Ausschleusen mittels Exosomen

kommen (Raposo and Stoorvogel 2013). Für die verschiedenen Kompartimente, die beim Transport beteiligt sind, wurden bereits eine Reihe spezifischer Marker identifiziert. Beispiele hierfür wären Rab5 für frühe Endosomen (Bucci, Parton et al. 1992, Nielsen, Severin et al. 1999), Rab7 für späte Endosomen (Vitelli, Santillo et al. 1997, Hyttinen, Niittykoski et al. 2013), Lamp-1 für Lysosomen (Chen, Murphy et al. 1985), oder Rab11 für Recyclingendosomen (Ullrich, Reinsch et al. 1996). In diesem Zusammenhang konnte mittels cLSM und der Aufnahme lebender Zellen gezeigt werden, dass die Reifung der frühen zum späten Endosom von einem Austausch von Rab5 durch Rab7 begleitet wird (Rink, Ghigo et al. 2005). Galvez et al. lieferten 2012 eine übersichtliche Zusammenfassung der am intrazellulären Transport beteiligten Organellen mit dazugehöriger Rab Protein Lokalisation (Galvez, Gilleron et al. 2012). Durch das Markieren solcher Proteine ist es möglich den Weg von verschiedenen NC innerhalb der Zelle zu rekonstruieren. Wobei der Einfluss dieser Proteine auf die Aufnahme und das intrazelluläre Trafficking z.B. durch deren Überexpression oder deren Knockdown analysiert werden kann. Dieser Vorgang erfordert jedoch eine erfolgreiche Transfektion, die vor allem bei primären Zellen nicht immer in ausreichendem Maße erreicht werden kann. Da auch die Verwendung von Inhibitoren, welche Endozytosewege ausschalten können, aufgrund mangelnder Spezifität limitiert ist, werden brauchbare Alternativen benötigt.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war es festzustellen ob über eine Modifikation von PS-Partikeln mit P(EtPPn) ein *Stealth*-Effekt in HS erreicht werden kann. Für in vivo Anwendungen ist die Etablierung einer solchen bioabbaubaren Alternative, zu aktuell hauptsächlich verwendeten nicht-bioabbaubaren Varianten, ein wichtiger Schritt um die Verträglichkeit von Nanomaterialien maßgeblich zu verbessern.

Der zweite Teil befasst sich mit der Validierung einer Methode zur Aufreinigung von Zellorganellen mittels magnetischer Säulen. Dies soll als zusätzliche Methode dienen um das intrazelluläre Schicksal von NC bestimmen zu können. So könnten über Endozytose aufgenommene Partikel auch bei untransfizierten Zellen qualitativ am cLSM und quantitativ am Durchflusszytometer auf die Kolo-kalisation mit bestimmten Endozytosemarkern hin untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien und primäre Zellen

Für die Versuche verwendete Zelltypen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zelllinien und primäre Zellen

Bezeichnung	Zelltyp	Anbieter
<b>Caco-2</b>	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie	CLS; Eppenheim; Deutschland
<b>Immature dendritische Zellen (iDC)</b>	Humane antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems	Generiert aus humanen Buffy-Coat; Universitätsmedizin Mainz; Deutschland

#### 2.1.2 Medien und Zusätze

Die für die Zellkultur benötigten Medien und Zusätze sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Medium und Zusätze

Bezeichnung	Anbieter
<b>DMEM</b>	life technologies™; Grand Island, NY; USA
<b>FBS</b>	Life Technologies GmbH; Darmstadt; Deutschland
<b>GlutaMAX™-I</b>	life technologies™; Grand Island, NY; USA
<b>GMCSF</b>	Sanofi; Bridgewater, NJ; USA
<b>Humanes Serum</b>	LONZA BioWhittaker®; Basel; Schweiz
<b>IL-4, human</b>	PromoCell GmbH; Heidelberg; Deutschland
<b>Penicillin Streptomycin</b>	life technologies™; Grand Island, NY; USA
<b>RPMI-1640</b>	SIGMA® LifeScience; St.Louis, MO; USA

### 2.1.3 Nanocarrier

Tabelle 3 zeigt die Nanocarrier, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Carboxy-funktionalisierten Partikel enthalten Eisenoxid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) und wurden von Diego Estupinan (MPIP) zur Verfügung gestellt. PS-COOH diente hierbei als Ausgangspartikel für PS-NHS, PS-IgG/CD63<sub>gek</sub> und PS-IgG/CD63<sub>ads</sub>. Die Amino-funktionalisierten Partikel wurden von Thomas Wolf und Katja Klein (MPIP) hergestellt, wobei PS-NH<sub>2</sub> als Grundpartikel für PS-NH<sub>2</sub>-PEG/ P(EtPPn)<sub>46</sub> verwendet wurde.

Tabelle 3: Nanocarrier

Carrier	Polymer	Funktionalisierung	Farbstoff	Durchmesser [nm]	Tensid
PS-COOH	Polystyrol	COOH	BODIPY*	241	SDS
PS-NHS	Polystyrol	NHS-Ester	BODIPY*	226	SDS
PS-CD63 <sub>gek</sub>	Polystyrol	anti CD63 (gekoppelt)	BODIPY*	316	SDS
PS-CD63 <sub>ads</sub>	Polystyrol	anti CD63 (adsorbiert)	BODIPY*	254	SDS
PS-IgG <sub>gek</sub>	Polystyrol	Maus IgG (gekoppelt)	BODIPY*	321	SDS
PS-IgG <sub>ads</sub>	Polystyrol	Maus IgG (adsorbiert)	BODIPY*	315	SDS
PS-NH <sub>2</sub>	Polystyrol	NH <sub>2</sub>	BODIPY*	107,5	CTMA-Cl
PS-NH <sub>2</sub> -P(EtPPn) <sub>46</sub>	Polystyrol	Ethylphosphonat	BODIPY*	130	CTMA-Cl
PS-NH <sub>2</sub> -PEG	Polystyrol	PEG	BODIPY*	226	CTMA-Cl

\*  $\lambda_{\text{ex}}$  523 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  536 nm

### 2.1.4 Antikörper

Für die Versuche verwendete Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Anbieter
Anti-Human CD11c	FITC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach; Deutschland
Anti-Human CD14	APC	BD Bioscience; San Jose; CA USA
Anti-Human CD45	APC	Biologend; Fell; Deutschland
Anti-Human CD63	-	Biologend; Fell; Deutschland
Anti-Human CD80	FITC	Biologend; Fell; Deutschland
Anti-Human CD83	FITC	Biologend; Fell; Deutschland
Anti-Human CD86	PacificBlue™	Biologend; Fell; Deutschland

<b>Antikörper</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Anti-Human HLA-DR</b>	PacificBlue™	Biologend; Fell; Deutschland
<b>Anti-Human IgG (kappa)</b>	-	Abcam plc; Cambridge; England
<b>Anti-Maus IgG</b>	Alexa Fluor 633	life technologies™; Eugene; OR USA
<b>Anti-Human Rab5</b>	-	BD Bioscience; San Jose; CA USA
<b>Maus IgG</b>	-	life technologies™; Frederick; MD USA
<b>Anti-Human EEA1</b>	Alexa Fluor 647	Abcam plc; Cambridge; England

### 2.1.5 Chemikalien

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
<b>0,25 % Trypsin/EDTA</b>	life technologies™; Grand Island; NY USA
<b>2° Antikörper Lösung anti-Maus (AP konjugiert)</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>Ammoniumsulfat</b>	AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland
<b>Anti-Maus IgG MicroBeads</b>	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach; Deutschland
<b>Bolt™ LDS Sample Buffer</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>Bolt™ Sample Reducing Agent</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>BSA</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>CDP-Star® AP Chemilumineszenz Substrat</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>CellMask™ Orange</b>	life technologies™; Eugene; OR USA
<b>CHAPS</b>	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
<b>Comassie® Brilliant Blau G250</b>	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
<b>cOmplete Tablets, Protease Inhibitor</b>	Roche; Mannheim; Deutschland
<b>Dimethylsulphoxid Hybri-Max®</b>	SIGMA® LifeScience; Steinheim; Deutschland
<b>EDTA</b>	AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland
<b>Essigsäure, ≥ 99.8%</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Harnstoff</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Heparin-Natrium</b>	RotexMedica; Trittau; Deutschland
<b>Lymphocyte Separation Medium</b>	LONZA; Walkersville; MD USA
<b>Methanol</b>	VWR International GmbH; Darmstadt; Deutschland
<b>NuPAGE® MES SDS Laufpuffer</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
<b>PBS</b>	life technologies™; Grand Island; NY USA
<b>PFA</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Pierce Reagenz</b>	Thermo Fisher Scientific; Rockford; IL USA
<b>Phosphorsäure, ≥ 85%</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Poly-L-Lysin</b>	SIGMA® LifeScience; St.Louis, MO USA
<b>Propidiumiodid</b>	Sigma-Aldrich; Steinheim; Deutschland
<b>SeeBlue® Plus2 Prestained Standard</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>Sheath Lösung CyFlow</b>	Systemex-Partec; Görlitz; Deutschland
<b>Thioharnstoff</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Triton™ X-100</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Trypanblau</b>	SIGMA®; Steinheim; Deutschland
<b>Trypsin</b>	life technologies™; Grand Island; NY USA
<b>Tween® 20</b>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH; Steinheim; Deutschland
<b>Wasser, steril</b>	B.BRAUN; Melsungen; Deutschland

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Die für die Versuche benötigten Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Einmalspritzen (1 ml, 50 ml)</b>	B.BRAUN; Melsungen; Deutschland
<b>27G Einmalkanüle</b>	B.BRAUN; Melsungen; Deutschland
<b>Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)</b>	Greiner bio-one; Frickenhausen; Deutschland
<b>Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>)</b>	Greiner bio-one; Frickenhausen; Deutschland
<b>LoBind Reaktionsgefäß 1,5 ml</b>	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
<b>Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)</b>	Greiner bio-one; Frickenhausen; Deutschland
<b>Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)</b>	STARLAB TipOne®; Hamburg; Deutschland
<b>8/18 µ-Well-Objektträger</b>	Ibidi; Martinsried; Deutschland
<b>6/12/24 Well-Platten</b>	Greiner bio-one; Frickenhausen; Deutschland
<b>Nitrilhandschuhe M</b>	Carl Roth; Karlsruhe; Deutschland
<b>Kryo-Röhrchen 2 ml</b>	Greiner bio-one; Frickenhausen; Deutschland
<b>Einmalskalpell</b>	B.BRAUN; Tuttingen; Deutschland
<b>Zellsieb 70 µm</b>	BD Bioscience; Durham; NC USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Sterivex™ Sterile Filter Unit 0,22 µm</b>	Millipore; Billerica; MA USA
<b>Bolt™ Mini Gel (10 %, 4-12%)</b>	life technologies™; Carlsbad; CA USA
<b>Filteraufsatz für Spritzen 0,2 µm</b>	Sartorius; Göttingen; Deutschland
<b>iBlot® Gel Transfer Stacks; PVDF, Mini</b>	Life Technologies; Carlsbad; CA USA
<b>Wägebepapier MN 226</b>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG; Düren; Deutschland
<b>Röhrchen für das Durchflusszytometer</b>	SARSTEDT AG & Co; Nümbrecht; Deutschland
<b>Parafilm®M</b>	Pechiney Plastic Packaging; Chicago; IL USA
<b>µMACS Säulen</b>	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach; Deutschland

### 2.1.7 Geräte

Die für die Versuche benötigten Geräte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Vortexer</b>	Heidolph; Schwabach; Deutschland
<b>HERAEUS PICO 21 Zentrifuge</b>	Thermo Scientific; Waltham; MA USA
<b>Zentrifuge 5810R/5804R</b>	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf; Deutschland
<b>Automatischer Zellzähler TC10™</b>	BIO-RAD Laboratories; München; Deutschland
<b>Neubauer Zählkammer</b>	HIRSCHMANN EM-Techcolor; Eberstadt; Deutschland
<b>Wasserbad</b>	Memmert; Schwabach; Deutschland
<b>Inkubator C200</b>	Labotect; Rosdorf; Deutschland
<b>Sterilbank C-[MaxPro]<sup>3</sup>-130</b>	Berner FlowSafe®; Künzelsau; Deutschland
<b>Sterilbank s@femate 1.2</b>	BIOAIR®; Vorhees Township; NJ USA
<b>Mikroskop CKX41</b>	Olympus; Hamburg; Deutschland
<b>Schüttler PS-M3D</b>	Grant-bio; Cambridgeshire; England
<b>Schüttler mit Heizfunktion HLC</b>	Ditabis; Pforzheim; Deutschland
<b>CyFlow ML</b>	Partec GmbH; Münster; Deutschland
<b>Bolt Mini Gel Tank</b>	life technologies™; Carlsbad; CA USA
<b>iBlot™</b>	Life Technologies GmbH; Darmstadt; Deutschland
<b>cLSM Leica TCS SP5 II</b>	Leica; Wetzlar; Deutschland
<b>PowerPac™ HC High-Current Power Supply</b>	BIO-RAD Laboratories, München; Deutschland
<b>Präzisionswaage AE100</b>	Mettler Toledo GmbH; Gießen; Deutschland
<b>EPSON ViewPix 1100</b>	biostep® GmbH; Jahnsdorf; Deutschland
<b>Luminescent Image Analyzer LAS-3000</b>	Fujifilm; Tokyo; Japan

Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81-ZDC	Olympus; Hamburg; Deutschland
µMACS Separator	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach; Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung dendritischer Zellen aus Buffy-Coat

Die Generierung dendritischer Zellen erfolgte aus dem Buffy-Coat gesunder menschlicher Spender. Die Gewinnung des Buffy-Coats war hierbei stets im Einklang mit der Deklaration von Helsinki (World Medical Association, WMA).

Der Buffy-Coat wurde zunächst in eine T175 Zellkulturflasche überführt und mit PBS auf 175 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung des Lymphozyten Separations Mediums (15 ml) mit je 35 ml des verdünnten Buffy-Coats in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Nach 20 min Zentrifugation bei 1100 g, ohne Beschleunigung und Bremse, wurde die PBMC Bande (weißer Ring zwischen Plasma und Medium) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 8 min bei 670 g zentrifugiert. Es folgten drei Waschstschritte mit PBS (5 min, 470 g), wobei beim zweiten Waschen die Zellen über einen Filter (70 µm) in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß gepoolt wurden. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Hierbei wurden verbliebene Erythrozyten vor der Zählung mit 1,8 %iger Essigsäure lysiert und tote Zellen durch Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden je 15 Mio. Zellen in 3 ml RPMI Medium (RPMI-1640 mit 2% HS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM GlutaMAX) in die Wells von 6 Well-Platten ausgesät. Nach 60–90 min Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte ein dreimaliges Waschen der adhärennten Zellen (Monozyten) mit PBS (37 °C) um Suspensionszellen zu entfernen. Nach Zugabe von 3 ml RPMI Medium mit 800 U/ml GMCSF und 500 U/ml IL4 pro Well wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden jeweils 800 µl des Überstandes in einem 15 ml Falcon gepoolt und für 5 min bei 470g zentrifugiert. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte in 1 ml/Well RPMI Medium, welches zusätzlich 1600 U/ml GMCSF und 500 U/ml IL4 beinhaltetete. Darauf folgte die Verteilung der Zellsuspension auf die einzelnen Well. Dieser Mediumswechsel wurde nach 48 h nach demselben



Schema wiederholt. Die Zugabe von IL4 und GMCSF zum Medium induzierte hierbei die Differenzierung der Monozyten zu iDCs (Zhou and Tedder 1996). Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte das Einfrieren der Zellen (siehe 2.2.1.2).

Um zu kontrollieren ob die Generierung der iDCs aus Monozyten erfolgreich verlaufen war, wurden 500.000 Zellen in insgesamt 1 ml PBS (4°C) aufgenommen, auf fünf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11c, CD14, CD45, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS (4°C) resuspendiert um die Expression der Marker mittels Durchflusszytometrie zu ermitteln. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Antikörperfärbung, wobei 1 % dieser Zellen jeweils in allen verwendeten Fluoreszenzkanälen des Durchflusszytometers als falsch positiv definiert wurden. Bei den anderen Proben wurden alle CD45 positiven Zellen auf die Expression der oben genannten Marker hin untersucht.

## 2.2.2 Zellkultur

Caco-2 Zellen, welche Rab5A-GFP konstitutiv überexprimieren (von Jonas Reinholz; MPIP), wurden in DMEM mit 10 % FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM GlutaMax und 0,2 µg/ml Puromycin kultiviert. Die Zugabe von Puromycin gewährleistete hierbei die Stabilität der Zelllinie, da nur transfizierte Zellen eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum aufweisen. Die Passage der Zelllinie erfolgte im subkonfluenten Status, wobei 40 Passagen nicht überschritten wurden. Die dendritischen Zellen wurden jeweils 24 h vor dem jeweiligen Versuch aufgetaut und in RPMI-1640 mit 2% HS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM GlutaMAX, 500 IU/ml IL4 und 1600 IU/ml GMCSF inkubiert. Die Inkubation aller Zellen erfolgte im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C und 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der iDCs wurde zunächst der Überstand abgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gepoolt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch 2–3-maliges Waschen mit kaltem 0,5 mM EDTA/PBS (4°C). Nach 5 min Zentrifugation der gepoolten Zellen bei 470 g wurden diese in 10 ml PBS resuspendiert und die Lebendzellzahl mit-

tels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die DCs nochmals zentrifugiert und in Einfriermedium, bestehend aus RPMI-1640 mit 20 % HS, 10 U/ml Natrium-Heparin und 10% DMSO, resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurden 1 Mio. Zellen in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Zunächst erfolgte eine Lagerung der Röhrchen für 2 d in einer Kryobox bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , danach wurden sie in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen wurden zunächst 10 ml des passenden Mediums im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Das Auftauen der in Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte ebenfalls im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Direkt nach dem Auftauen wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in das vorgewärmte Medium überführt und 5 min bei 500g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in passendem Medium resuspendiert und in die gewünschte Anzahl an Wells ausgesät. Die iDCs wurden 24 h nach Aussaat für Versuche verwendet.

### 2.2.3 Aggregationstest am Fluoreszenzmikroskop

Um sicherzugehen, dass die Partikel in den verwendeten Lösungen und Medien nicht aggregieren erfolgte vor Beginn der eigentlichen Versuche stets ein Aggregationstest am Fluoreszenzmikroskop. Hierfür wurden  $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  des jeweiligen Partikels in einem Gesamtvolumen von  $20\text{ }\mu\text{l}$  mit PBS und Medium (0, 2, 10 und 100% Serum) pipettiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Aggregate untersucht. Der Test erfolgte auf  $18\mu$ -Well-Objektträgern bei einer 400x Vergrößerung.

### 2.2.4 Durchflusszytometrie

Bei Versuchen mit Zellen erfolgte die Messung am Durchflusszytometer bei einer Laserleistung von 40 mW. Für die bessere Detektion von Vesikeln wurde die Leistung bei der Messung auf 200 mW erhöht. Um einen konstanten Durchfluss der Probe im Instrument zu gewährleisten, erfolgte die Aufnahme der Messergebnisse 5 sec (Zellen) oder 30 sec (Vesikel) nach Messbeginn. Außerdem wurde sowohl die Sheath Lösung als auch das PBS über einen  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  beziehungsweise einen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Filter filtriert um Artefakte zu vermindern.

#### 2.2.4.1 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität der Amino-funktionalisierten Nanocarrier zu bestimmen wurden je 100.000 iDCs mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (10; 20; 37,5; 75 und 150 µg/ml) unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die im Überstand befindlichen Suspensionszellen, sowie die toten Zellen, wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Ablösen der adhären-ten Zellen mit 0,5 mM EDTA/PBS (4°C) wurden diese mit denen aus dem Überstand gepoolt, einmal mit PBS (4°C) gewaschen und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 800 µl PBS (4°C) resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen. Tote Zellen wurden kurz vor der Messung durch die Zugabe von 2 µg/ml PI angefärbt. Die Viabilität der Negativkontrolle wurde als 100 % definiert.

#### 2.2.4.2 Detektion der Nanocarrierbindung

Für die Detektion der Nanocarrierbindung wurden 100.000–150.000 iDCs in 200 µl Medium mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen (0 %, 10 % und 100% HS) in die Wells einer 24-Wellplatte ausgesät und mit 20 µg/ml Partikel für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, welche in den jeweiligen Serumkonzentrationen inkubiert wurden. Die adhären-ten Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation mit 0,5 mM EDTA/PBS (4°C) abgelöst, zusammen mit den Suspensionszellen aus dem Überstand einmal mit PBS gewaschen und abschließend für die Analyse im Durchflusszytometer in 800 µl kaltem PBS (4°C) resuspendiert. Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte jeweils für 5 min bei 500 g. Um tote Zellen bei der Auswertung ausschließen zu können, erfolgte ein Anfärben dieser Zellen mit 2 µg/ml PI kurz vor Beginn der Messung. Bei der Negativkontrolle wurde 1% der Zellen im Fluoreszenzkanal als falsch positiv definiert.

#### 2.2.4.3 Vorinkubation der Partikel mit IgG reduziertem Plasma

Die Vorinkubation der Partikel mit IgG reduziertem und nicht-reduziertem Citratplasma (von Johanna Simon, MPIP) erfolgte für 1 h bei 37°C und 300 rpm auf dem Thermoschüttler. Hierfür wurden 5 mg Protein für 0,05 m<sup>2</sup> Partikel verwendet (Berechnung siehe 2.2.5.5). Um die Bedingungen für alle Partikel gleich zu halten erfolgte die Inkubation in einem Gesamtvolumen von 175 µl, wobei geringere Volumina mit sterilem Was-

ser aufgefüllt wurden. Nach der Inkubation wurde für 30 min bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert und das entstandene Pellet mit sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Nanocarrierbindung mittels Durchflusszytometrie, wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Als weitere Vergleichsprobe dienten Partikel, welche nicht vorinkubiert wurden.

### 2.2.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um ein Überschneiden der Anregungs- und Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe zu vermindern, wurden alle Messungen am cLSM über sequentielle Scans durchgeführt. Des Weiteren erfolgte bei jeder Probe die Aufnahme eines z-Stacks um sicherzustellen, dass sich die Partikel im Innern der Zelle befinden und nicht lediglich an der Membran adsorbiert wurden. Für alle Versuche wurde eine 630x Vergrößerung verwendet.

#### 2.2.5.1 Detektion der NanocARRIERaufnahme in iDCs mittels cLSM

Für die Analyse mittels cLSM wurden die Zellen in eine 24-Wellplatte ausgesät (100.000 Zellen pro Well) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 20 µg/ml Partikel zu den Zellen pipettiert. Nach 2 h Inkubation erfolgte das Ablösen der Zellen mit 0,5 mM EDTA/PBS (4°C). Diese Zellen und der jeweilige Überstand wurden anschließend gepoolt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert, in 200 µl Medium aufgenommen und in 8-µ-Well Objektträger ausgesät. Um das Anhaften der Suspensionszellen zu ermöglichen, erfolgte 24 h vor Aussaat eine Beschichtung dieser Wells mit Poly-L-Lysin (1:10 in PBS) bei 4°C im Kühlschrank. Die Wells wurden vor der oben genannten Zellaussaat zweimal mit PBS und einmal mit dem zugehörigen Medium gewaschen. Nach 1 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte in PBS bei 4 °C im Dunkeln. Kurz vor der Messung wurde 5 µg/ml CellMask™ Orange zu der jeweiligen Probe gegeben um die Zellmembran sichtbar zu machen. Um ein Anfärben des Zytoskeletts zu vermeiden wurden die Zellen nach sehr kurzer Inkubation (<30 sek) mit PBS gewaschen und direkt danach gemessen.

### 2.2.5.2 Detektion der Antikörperfunktionalisierung von Nanocarriern

Für die Messung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden PBS, 0,4 µg der Carboxy-funktionalisierten Partikel und 0,5 µl Alexa Fluor® 633 anti-Maus IgG (Gesamtvolumen 20 µl) in die Wells eines 18-µ-Well Objektträgers pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min im Dunkeln bei RT und unmittelbar darauf die Messung. Für die spätere Quantifizierung mittels ImageJ wurde jeweils die gleiche Vergrößerung eingestellt um die Fluoreszenzintensitäten der Nanopartikel untereinander vergleichbar zu halten. Durch das Programm ImageJ erfolgte die Definition der Partikelpositionen über das BODIPY-Signal bei einem *Threshold* von 40. An diesen definierten Positionen wurden dann die Fluoreszenzintensitäten der sekundären Antikörper analysiert. Insgesamt wurden die Fluoreszenzintensitäten 80 solcher randomisierten Positionen pro Funktionalisierung mittels Microsoft Excel 2010 ausgewertet.

### 2.2.6 Aufreinigung der harten Proteinkorona von Nanocarriern

Die Aufreinigung der harten Proteinkorona erfolgte nur für die Amino-funktionalisierten Partikel von Thomas Wolf und Katja Klein. Hierfür wurden 0,05 m<sup>2</sup> Partikel (Berechnung siehe 2.2.5.5) in ein 1,5 ml *LoBind* Reaktionsgefäß pipettiert und mit sterilem Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml HS in verschiedenen Konzentrationen (10 %, 100 %) und eine Inkubation über 2 h bei 37 °C und 300 rpm auf dem Thermoschüttler. Daraufhin folgten drei Waschschriffe mit 1 ml PBS (4°C), wobei nach jedem die Proben für 1 h bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert wurden. Um die harte Proteinkorona von den Partikeln zu lösen erfolgte nach dreimaligem Waschen das Resuspendieren der Pellets mit 100 µl Harnstoffpuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS) und eine Inkubation dieser Suspension für 15 min bei 37 °C und 600 rpm. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml *LoBind* Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.6.1 Pierce Assay

Zur Quantifizierung der Proteine wurde ein Pierce Assay durchgeführt, wobei verschiedene BSA-Konzentrationen (0, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 und 2000 µg/ml) gelöst in Harnstoffpuffer als Standard dienten. Für die Absorptionmessung wurden 10 µl je Probe und Standard in die Wells einer transparenten 96-Well Platte pipettiert. Dabei

erfolgte eine Dreifachbestimmung der Proben und eine Doppelbestimmung der Standards. Vor der Messung der Absorption bei 660 nm am Plate Reader wurden 150 µl Pierce Reagenz hinzu pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert.

#### 2.2.6.2 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde ein 4-12 %iges oder ein 10%iges Polyacrylamidgel verwendet, wobei als Referenz verdünntes HS (1:200 in Harnstoffpuffer) diente. Zur Linearisierung der Proteine erfolgte zunächst eine Inkubation der aufgereinigten harten Proteinkorona (siehe 2.2.6) und der Referenz mit Reduktionsmittel (1X) und Probenpuffer (1X) für 10 min bei 70 °C in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Proben wurden dann in die Taschen des Gels pipettiert, wobei 10 µl vom SeeBlue® Standard als Größennachweis diente. Zur Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte das Anlegen einer Spannung von 100 V bis der Laufpuffer das Ende des Gels erreicht hatte (circa 1 h).

#### 2.2.6.3 Comassie Färbung

Zunächst erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem 4-12%igem Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.6.2). Daraufhin wurde das Gel fixiert (10 % Essigsäure, 40% Ethanol), drei Mal mit VE-Wasser gewaschen und mit einer CBB Färbelösung aus 10 % Ammoniumsulfat, 2 % Phosphorsäure, 0.1 % CBB in Wasser und 20% Methanol für 24 h gefärbt. Zum Entfernen überflüssigem CBBs wurde drei Mal mit 1% Essigsäure für jeweils 10 min gewaschen. Eine Inkubation in VE-Wasser ermöglichte daraufhin die Entfernung der Essigsäure. Die Digitalisierung des Gels erfolgte mittels EPSON ViewPix 1100 mit einer Auflösung von 600 dpi.

#### 2.2.6.4 Western Blot

Zunächst wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%igem Polyacrylamidgel durchgeführt (siehe 2.2.6.2). Mit Hilfe des iBlot Systems erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran unter Verwendung von Programm 2, welches das Blotten innerhalb von 6 min beendet. Zum Blocken wurde die Membran mit 3% BSA/PBS für 30 min bei 20 rpm inkubiert und danach zweimal für 5 min mit 20 ml VE-Wasser gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper Maus anti-

human IgG, welcher 1:500 mit Waschpuffer (PBS mit 1% BSA und 0,1 % Tween<sup>®</sup>20) verdünnt wurde, erfolgte für 30 min bei 20 rpm. Nach drei Waschschritten für 5 min mit Waschpuffer folgten 30 min Inkubation mit der 2°Antikörperlösung (AP konjugiert). Anschließend wurde die Membran drei Mal für 5 min mit Waschpuffer und zwei Mal mit VE-Wasser gewaschen. Nachdem die Membran mit CDP-Star Chemilumineszenz Substrat, ein Dioxetan basierendes Substrat zur Detektion von AP, bedeckt wurde, erfolgte die Messung der Chemilumineszenz durch den Sekundärantikörper (AP konjugiert) mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000 bei einer Belichtungszeit von 3 min und der Intensität „Super“.

### 2.2.6.5 Oberflächenberechnung

Um die Oberfläche und somit das einzusetzende Volumen an Partikeln zu bestimmen, erfolgte zunächst die Berechnung der Fläche der Partikel (Oberfläche einer Kugel) und die Anzahl an Partikeln in 1 ml. Durch die Multiplikation beider Werte ergibt sich die Fläche in 1 ml und daraus wiederum erfolgte die Bestimmung des Volumens. Das Volumen setzt sich hierbei aus der gewünschten Fläche (0,05 m<sup>2</sup>) multipliziert mit 1000 und dividiert durch die Fläche in 1 ml zusammen.

$$A = 4\pi r^2$$

$$n_{NP} = w/m_{NP}$$

$$V_{0,05m^2} = 0,05 * 1000 / n_{NP} A$$

A...Fläche [m<sup>2</sup>]

n<sub>NP</sub>... Anzahl Partikel in 1 ml

w...Feststoffgehalt [g/ml]

m<sub>NP</sub>...Masse NP [g]

V...Volumen [μl]

Nanopartikel	A [m <sup>2</sup> ]	w	m <sub>NP</sub>	n <sub>NP</sub>	V <sub>0,05m<sup>2</sup></sub>
PS-NH <sub>2</sub>	0,05	0,002	6,83E-16	2,93E+12	470,31
PS-NH <sub>2</sub> -PEG	0,05	0,0021	6,35E-15	3,31E+11	941,67
PS-NH <sub>2</sub> -P(EtPPn) <sub>46</sub>	0,05	0,0023	1,21E-15	1,9E+12	494,57

### 2.2.7 Vesikelaufreinigung über μMACS-Säulen

Das für die Vesikelaufreinigung verwendete PBS wurde zuvor über einen 0,2 μm Filter steril filtriert. Dies soll das Auftreten von Artefakten bei der anschließenden Messung am Durchflusszytometer vermindern. Um die Aktivität von Proteasen zu hemmen erfolgten die Zellyse und die darauf folgenden Inkubationsschritte stets auf Eis und unter

Verwendung eines kommerziellen Protease Inhibitors. Hierfür wurde eine Tablette des Protease Inhibitors in 10 ml PBS gelöst und anschließend laut Herstellerangabe bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aliquotiert gelagert.

Zunächst wurden die  $\mu\text{MACS}$  Säulen im MACS Separator platziert und mit 0,5% Tween<sup>®</sup>20/PBS gestartet. Tween<sup>®</sup>20 dient hierbei zur Verringerung der Oberflächenspannung der Lösung. Nachdem die Säule mit 800  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen wurde, erfolgte die Aufreinigung der magnetisch markierten Vesikel. Die Probe wurde hierfür auf 1 ml mit PBS aufgefüllt, auf die Säule pipettiert und dreimal mit 400  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Für den Elutionsschritt wurde die Säule vom Separator entfernt und auf einem Röhrchen für die Durchflusszytometrie platziert. Die Elution erfolgte mit 800  $\mu\text{l}$  PBS.

#### 2.2.7.1 $\mu\text{MACS}$ und magnetische Nanocarrier

Für die Versuche zur Aufreinigung der magnetischen Nanopartikel enthaltenden Vesikel wurden die superparamagnetischen Nanopartikel von Diego Estupinan (MPIP) mit Carboxy-Funktionalisierung bei iDCs eingesetzt. Je Probe wurden 500.000 Zellen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Inkubation der Nanopartikel (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 2 h unter Standardbedingungen. Anschließend wurden die adhärenen Zellen mittels 0,5 mM EDTA/PBS ( $4^{\circ}\text{C}$ ) abgelöst und mit den Suspensionszellen aus dem Überstand in einem 15 ml Reaktionsgefäß gepoolt. Die Zellen wurden bei 500 g für 5 min zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  PBS/Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe einer 27G Kanüle, durch welche die Probe circa 30 Mal mit einer 1 ml Spritze gepresst wurde um die Zellen mechanisch aufzuschließen. Über ein Mikroskop wurde kontrolliert ob noch intakte Zellen vorhanden waren oder der Vorgang beendet werden konnte. Um das Lysat von größeren Zellfragmenten und den Zellkernen zu trennen, folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 500 g für 5 min und  $4^{\circ}\text{C}$ , wobei jeweils der Überstand in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach der darauf folgenden Aufreinigung über die  $\mu\text{MACS}$  Säulen (siehe 2.2.7) wurde das Lysat entweder auf 1,5 ml Reaktionsgefäße zur Antikörperfärbung, oder auf Röhrchen für die Messung am Durchflusszytometer verteilt. Für die Messung wurden die Proben stets auf 800  $\mu\text{l}$  mit PBS ( $4^{\circ}\text{C}$ ) aufgefüllt.

Um festzustellen ob die aufgereinigten Vesikel noch intakt waren, erfolgte das Anfärben der Vesikelmembran mit CellMask<sup>™</sup> Orange. Nach der Säulenaufreinigung (siehe



2.2.7) von PS-COOH enthaltenden Vesikeln wurden 0,1 µg/ml CellMask™ Orange zu den Proben pipettiert und diese dann direkt gemessen. Als Kontrollen dienten sowohl die Partikel, als auch in unbehandeltem Zellysate vorinkubierte PS-COOH Partikel.

Als weiterer Nachweis zur Intaktheit der Vesikelmembran wurden die Eisenoxidpartikel PS-COOH und PS-CD63<sub>gek</sub> verwendet. Nach der Säulenaufreinigung (siehe 2.2.7) wurde eine Hälfte der Proben mit 5% Formaldehyd und 0,25% TritonX für 30 min fixiert um die Vesikelmembran für Antikörper durchlässig zu machen, während die andere Hälfte unfixiert blieb. Zu allen Proben, außer den Negativkontrollen, wurden 4 µg/ml Alexa Fluor® 633 markiertes anti-Maus IgG pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die unfixierten Proben auf 800 µl und die fixierten auf 1600 µl aufgefüllt, da aufgrund der Fixierungslösung die Anzahl an Events pro Sekunde beim Messen ansonsten zu hoch ausfällt.

#### 2.2.7.2 PS-COOH enthaltende Vesikel im TEM

Die Untersuchung des Säuleneluates und des Säulenüberstandes der PS-COOH Probe mittels TEM erfolgte mit Hilfe von Patricia Renz (MPIP). Der Säulenüberstand wurde hierbei nach der Aufreinigung durch das Pipettieren von 200 µl PBS auf die Säule und direktes Abnehmen mit einer Pipette erhalten und sollte Aufschluss darüber geben ob alle Partikel die Säule passieren, oder ob ein Teil zurückgehalten wurde. Für diesen Versuch erfolgte das Aussäen von 3 Mio. iDCs in 3 Wells einer 24-Well-Platte und die Behandlung dieser mit je 150 µg/ml PS-COOH. Ansonsten wurde die Aufreinigung der Vesikel wie unter 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Für die Aufnahmen unter dem TEM erfolgte keine weitere Behandlung der Proben, diese wurde lediglich auf das Gitter für das TEM aufgetropft und getrocknet. Für eine Kontrastierung mit Uranylacetat (De Carlo and Harris 2011), welches die Vesikelmembran sichtbar macht, ist eine höhere Konzentration an Vesikeln nötig, da durch das Uranylacetat auch mehr Hintergrund zu sehen ist, was eine Identifikation der Vesikel erschwert.

#### 2.2.7.3 µMACS und Anti-Maus IgG MicroBeads

Um Rab5 positive Vesikel mit Hilfe der Anti-Maus IgG MicroBeads zu extrahieren, wurden 2-3 Mio. Caco-2 Zellen, welche Rab5A-GFP konstitutiv überexprimieren ly-

siert. Die Lyse der Zellen erfolgte auch hier wieder mit Hilfe einer 27G Kanüle (siehe 2.2.7.1). Danach wurde das Lysat gleichmäßig auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit PBS auf 200  $\mu$ l aufgefüllt, 1  $\mu$ g anti-human Rab5 zu den jeweiligen Proben pipettiert und 30 min bei 300 rpm auf Eis inkubiert. Parallel und unter gleichen Bedingungen erfolgte die Vorinkubation der Beads mit 50 %, 33 % und 9 % HS um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die vorinkubierten Beads wurden anschließend bei 10000 g zentrifugiert und in 20  $\mu$ l PBS resuspendiert um dann zu den Lysatproben pipettiert zu werden. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 300 rpm auf Eis erfolgte die Aufreinigung der an die Beads gebundenen Rab5 positiven Vesikel über die  $\mu$ MACS Säulen (siehe 2.2.7), wobei das Eluat entweder in 1,5 ml Reaktionsgefäße zur Antikörperfärbung (Gesamtvolumen 400  $\mu$ l), oder in Röhrchen für die Messung am Durchflusszytometer (Gesamtvolumen 800  $\mu$ l) verteilt wurde. Als Kontrolle diente Lysat ohne Markierung der Vesikel durch anti Rab5. Anhand der Messung des verwendeten PBS wurde 1% der Events im Fluoreszenzkanal als falsch positiv definiert.

Für die Antikörperfärbung wurden zunächst 40  $\mu$ l HS zu den Proben pipettiert um unspezifische Bindungen zu minimieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der jeweiligen Proben mit 4  $\mu$ g anti EEA1 für 30 min bei 300 rpm auf Eis. Um freien Antikörper aus der Probe zu entfernen, wurden die Proben auf 1 ml mit PBS (4°C) aufgefüllt und über  $\mu$ MACS Säule gewaschen und mit 800  $\mu$ l PBS (4°C) eluiert (siehe 2.2.7). Zur Auswertung der Durchflusszytometerdaten wurden die GFP positiven Events herangezogen und der prozentuale Anteil an EEA1 innerhalb dieser Population ermittelt.

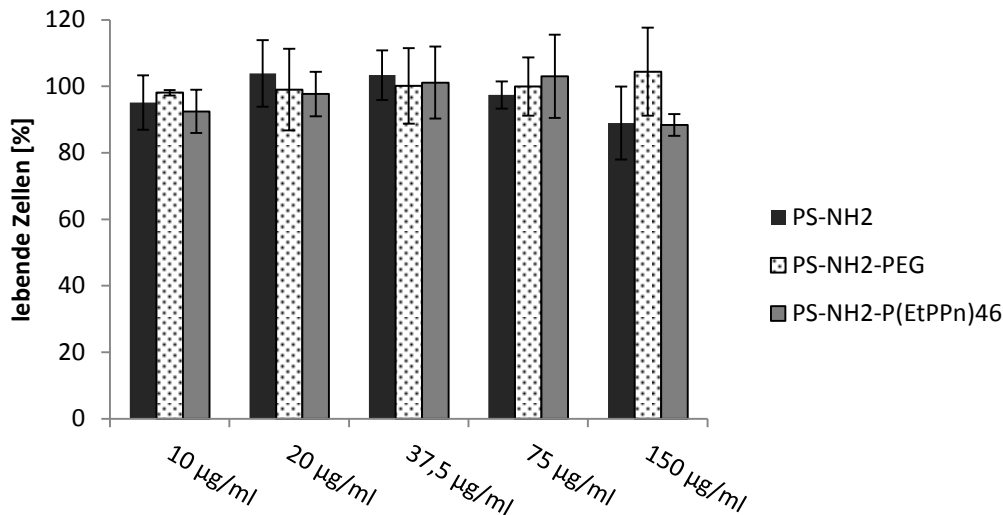
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Polystyrolpartikel mit *Stealth*-Effekt

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden ob mittels einer Funktionalisierung mit Polyethylphosphonaten ein *Stealth*-Effekt erzeugt werden kann. Ein solcher Effekt würde die Partikel befähigen an der Immunabwehr vorbei zum Zielgewebe zu gelangen. Wobei Immunzellen als Zielstruktur keineswegs ausgeschlossen sind, da auch diese über eine zusätzliche Funktionalisierung der Oberfläche angesteuert werden können. Bis jetzt wurden Nanocarrier bevorzugt durch eine Modifizierung mit PEG 'getarnt', welches jedoch nicht bioabbaubar ist. Daher ist es von großer Bedeutung eine geeignete abbaubare Alternative wie P(EtPPn) zu etablieren. Um den Effekt der Funktionalisierung untersuchen zu können wurde die Aufnahme in iDCs untersucht, welche als phagozytierende antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems optimal geeignet sind. Körperfremde Stoffe im Blutkreislauf werden schnell durch iDCs erkannt, aufgenommen und deren spezifische Antigene über MHC-II Komplexe präsentiert. Durch die Anlagerung von Opsoninen an die injizierten Carrier wird dieser Prozess unterstützt. Demnach ist für eine Verlängerung der Zirkulationszeit der Carrier im Blut eine Funktionalisierung notwendig die der Anlagerung von Proteinen entgegenwirkt.

#### 3.1.1 P(EtPPn) Funktionalisierung verringert Zytotoxizität

Zunächst wurde geklärt ob die Nanopartikel zytotoxisch sind. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Partikelkonzentrationen (0, 10; 20; 37,5; 75 und 150 µg/ml) inkubiert. Über ein Anfärben der Zellen mit 2 µg/ml PI wurden dann am Durchflusszytometer tote Zellen identifiziert. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen wurde bei der Negativkontrolle (0 µg/ml Partikel) als 100% definiert und davon ausgehend die Viabilität der anderen Proben kalkuliert.

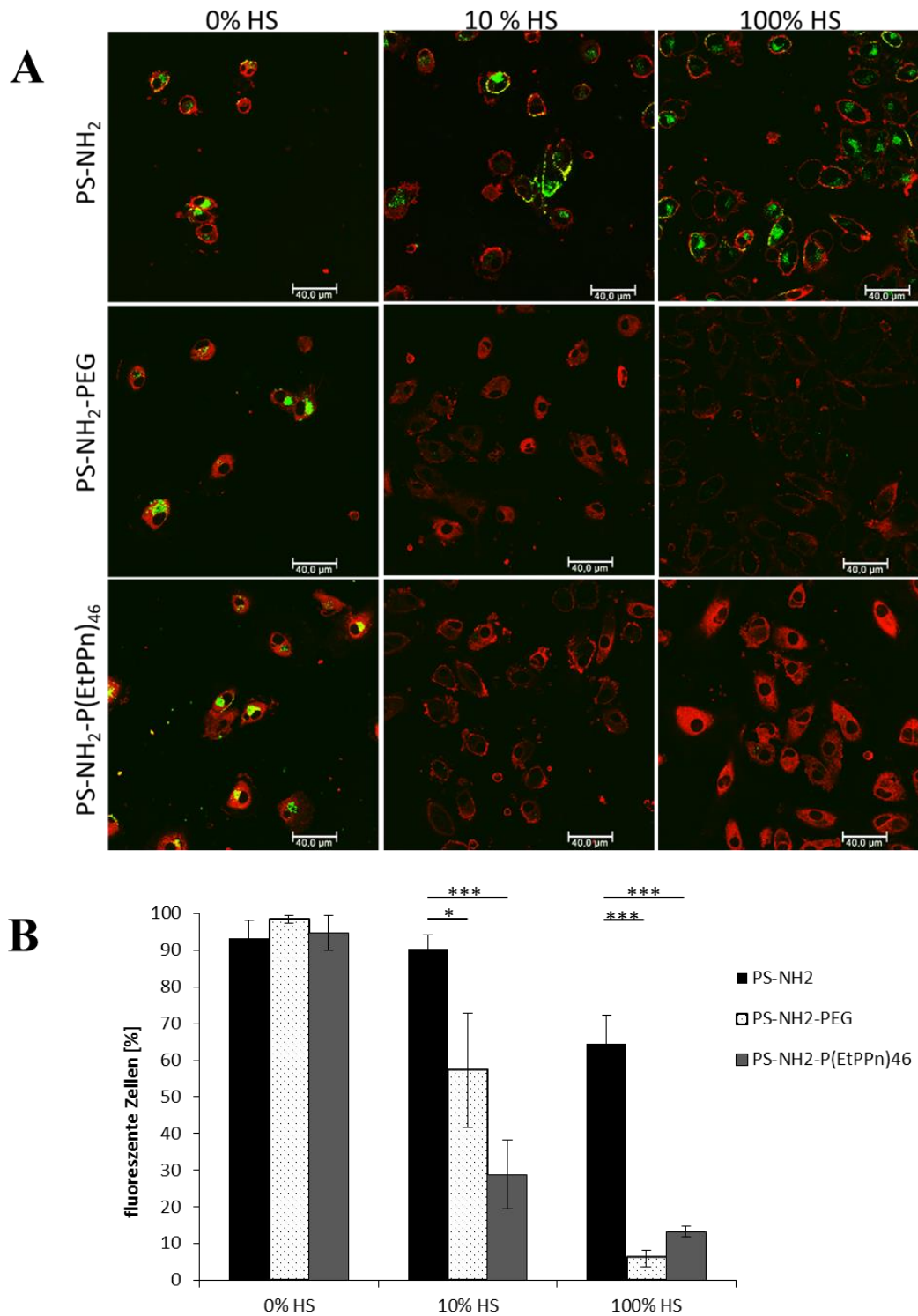


**Abbildung 4: Zytotoxizitätstest der aminofunktionalisierten PS-Nanopartikel.** IDCs wurden für 24 h mit verschiedenen Partikelkonzentrationen inkubiert. Die Quantifizierung der lebenden Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei tote Zellen über PI Färbung (2 µg/ml) detektiert wurden.

In Abbildung 4 ist ersichtlich, dass nach 24 h Stunden 90-100% der Zellen PI negativ sind. Jedoch ist anhand der Rohdaten (nicht gezeigt) eine beginnende Toxizität für die PS-NH<sub>2</sub> Partikel ab 37,5 µg/ml ersichtlich. So befinden sich bei einer Darstellung des Fluoreszenzkanals von PI (logarithmische Skalierung) in einem Histogramm die Lebendzellpopulation bei 10<sup>1</sup> und die der PI positiven bei 10<sup>3</sup>. Bei den PS-NH<sub>2</sub> Partikeln beginnt die Lebendzellpopulation ab einer Konzentration von 37,5 µg/ml höhere Fluoreszenzwerte (2-3x 10<sup>1</sup>) zu erreichen. Da diese Beobachtung erst ab einer Konzentration von 37,5 µg/ml gemacht wurde, erfolgten die weiteren Versuche unter Verwendung von 20 µg/ml.

### 3.1.2 Aufnahme der PS-Partikel in iDCs

Um zu zeigen, dass die Partikel von den iDCs aufgenommen werden, erfolgte nach 2 h Inkubation eine Untersuchung der Zellen qualitativ mittels cLSM. Durch die Inkubation in unterschiedlichen Serumkonzentrationen konnte neben der Untersuchung der Aufnahme auch ein möglicher *Stealth*-Effekt analysiert werden.

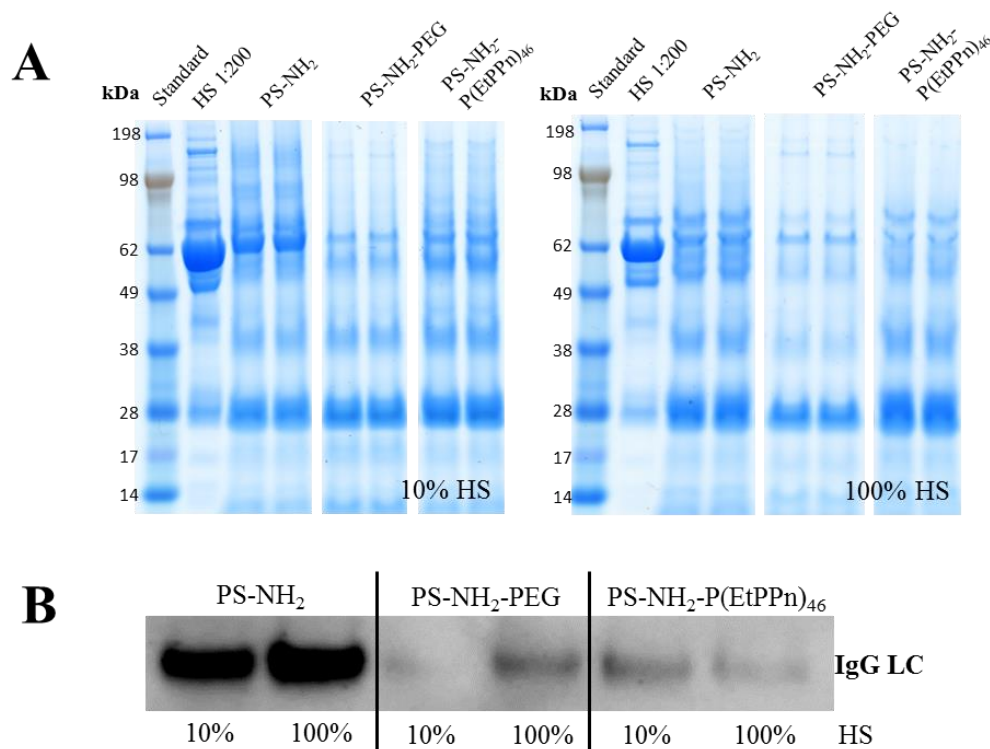


**Abbildung 5: Aufnahme und *Stealth*-Effekt von PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen.** IDCs wurden für 2 h mit 20 μg/ml Partikel in Medium mit 0%, 10% und 100% HS inkubiert. (A) cLSM Aufnahmen der fixierten Zellen. In grün sind die mit BODYPI markierten Partikel und in rot die über CellMask Orange angefärbten Zellmembranen dargestellt. (B) Quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;  $n=3$ .

Alle drei Partikel werden sehr gut in serumfreier Umgebung von den Zellen aufgenommen, jedoch wird sowohl bei 10% als auch bei 100% HS die Aufnahme der mit PEG beziehungsweise P(EtPPn)<sub>46</sub> funktionalisierten Partikel im Vergleich zu PS-NH<sub>2</sub> stark reduziert (Abbildung 5A). Des Weiteren zeigen die Aufnahmen bei einigen Zellen eine Adsorption der Partikel an die Zellmembran, wobei sich aber stets auch Partikel im Zellinneren befinden. Diese Beobachtung wurde mittels eines z-Stacks (nicht gezeigt) für alle Proben bestätigt. Durch das Anhaften der Partikel an die Zellmembran wird bei einer Messung am Durchflusszytometer eine Fluoreszenzintensität angezeigt, die nicht nur die Aufnahme der Partikel in die Zelle widerspiegelt. Um einen solchen systemischen Fehler zu vermeiden wurden die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten nicht anhand der Intensität, sondern anhand des prozentualen Anteils BODIPY positiver Zellen ausgewertet. Die hierbei erhaltenen Werte bestätigen die Beobachtungen am cLSM (Abbildung 5B). So werden sowohl die PEGylierten, als auch die mit P(EtPPn)<sub>46</sub> funktionalisierten PS-Partikel bei 10% und 100% Serum von signifikant weniger Zellen aufgenommen als die nackten PS-NH<sub>2</sub>. Wohingegen bei 0% HS nahezu 100% der Zellen eine Partikelaufnahme zeigen.

### 3.1.3 Die Oberflächenfunktionalisierung bestimmt die Zusammensetzung der Proteinkorona

Da die Proteinkorona eine Schlüsselfunktion bei der Partikelaufnahme innehat und die Funktionalisierung der Partikel die Zusammensetzung dieser verändern kann (Lundqvist, Stigler et al. 2008, Ehrenberg, Friedman et al. 2009, Guarnieri, Guaccio et al. 2011, Lesniak, Fenaroli et al. 2012), ist eine Charakterisierung der Korona ein wichtiger Ansatzpunkt um die Interaktion zwischen Zellen und Partikeln gezielt beeinflussen zu können. Die Partikel wurden hierfür in 10 % und 100 % HS für 2 h inkubiert und anschließend deren harte Proteinkorona aufgereinigt. Die so erhaltene Proteinlösung wurde zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt und dann mittels Comassie-Färbung visualisiert.



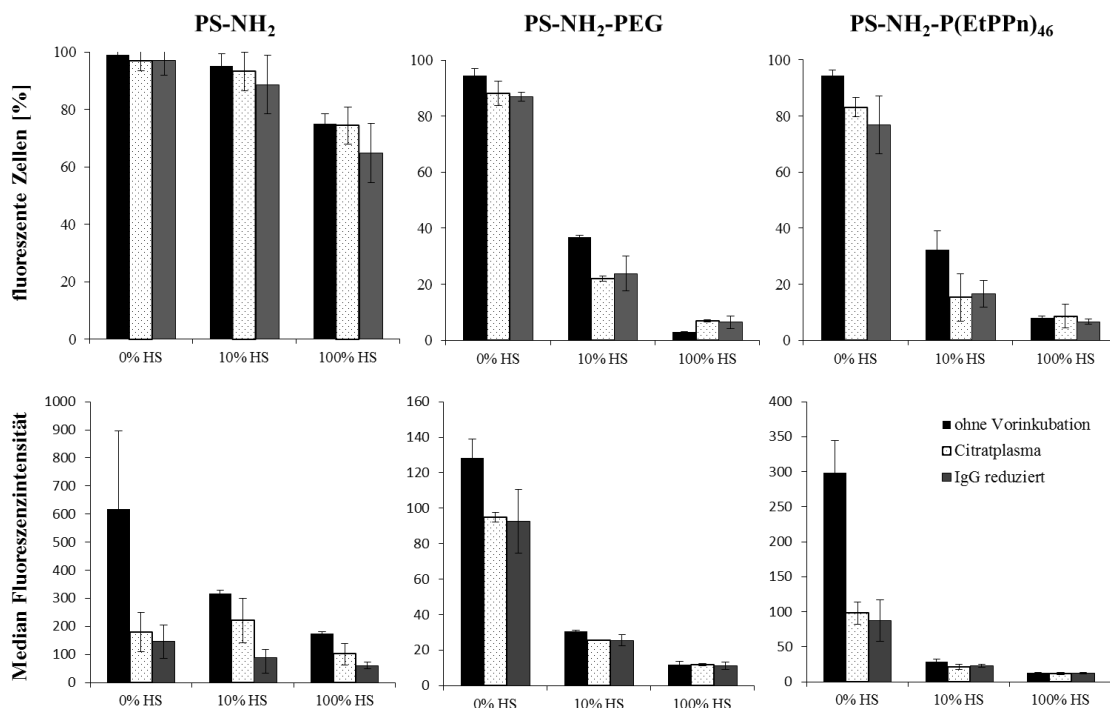
**Abbildung 6: Unterschiede in der Zusammensetzung der harten Proteinkorona bei aminofunktionalisierten PS-Partikel.** Nach Aufreinigung der harten Proteinkorona bei unterschiedlichen HS-Konzentrationen wurde mittels SDS-PAGE 16,25  $\mu$ l der Proteinkorona nach Größe aufgetrennt. (A) Comassie-Färbung. (B) Quantifizierung des Anteils an IgG LC mittels Western Blot Analyse.

Da einige der im HS enthaltenen Proteine ähnliche Molekülmassen aufweisen, ist eine genaue Definition der Banden in Abbildung 6A nicht möglich. Jedoch ist ersichtlich, dass die Zusammensetzung der Koronen voneinander abweichen. So sind die Banden von PS-NH<sub>2</sub>-PEG meist schwächer als bei PS-NH<sub>2</sub> und PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub>. Gut ersichtlich ist dies in dem Bereich von etwa 50 bis 66 kDa, in dessen Größenordnung sich beispielsweise Fibrinogene (drei UE; 65, 55, 47 kDa), IgG HC (50 kDa) und Albumin (66 kDa) befinden. Der Unterschied zwischen den Koronen der P(EtPPn) Oberflächenfunktionalisierung und PS-NH<sub>2</sub> ist nicht ganz so deutlich, lediglich auf Höhe des 62 kDa Markers und bei etwa 50 kDa zeigen sich besonders bei 10 % HS unterschiedlich dicke Banden. Hierbei ist in 10 % HS bei etwa 50 kDa eine höhere Proteinkonzentration in der Korona von PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> im Gegensatz zu der von PS-NH<sub>2</sub> zu verzeichnen. In 100 % HS ist jedoch das genaue Gegenteil ersichtlich. Interessanterweise ist auch bei der PEGylierten Probe eine Abnahme der Bandenintensität von 10 % HS zu 100 % HS an dieser Position feststellbar. Gemeinsamkeiten zwischen den Koronen der mit P(EtPPn) und PEG funktionalisierten Partikel, besonders wenn diese gleichzeitig

einen Unterschied zu PS-NH<sub>2</sub> darstellen, sind vielversprechende Ansatzpunkte. Eine genauere Untersuchung des IgG Anteils (Abbildung 6B) über einen Western Blot und eine Auswertung der relativen Dichte der Banden mittels ImageJ zeigte, dass IgG in der Proteinkorona von PS-NH<sub>2</sub>-PEG und PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> zu 70-90 % geringer konzentriert ist, als in der von PS-NH<sub>2</sub>.

### 3.1.4 Einfluss von IgG auf die Aufnahme

Da der Anteil an IgG in der Proteinkorona von PS-NH<sub>2</sub>-PEG und PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> im Gegensatz zu PS-NH<sub>2</sub> wesentlich geringer ist, stellt sich die Frage ob dieses auch an den Aufnahmeprozessen in iDCs beteiligt ist. Um dies zu untersuchen erfolgte vor der Zugabe zu den Zellen eine Vorbehandlung der Partikel mit Citratplasma bei welchem der IgG Anteil über Affinitätschromatografie von 30% auf 4-5% reduziert wurde, beziehungsweise zum Vergleich mit nicht reduziertem Citratplasma.



**Abbildung 7: Einfluss von IgG auf die Nanocarrier Aufnahme.** Die Partikel wurden unbehandelt, oder in Citratplasma beziehungsweise IgG reduziertem Citratplasma für 2 h vorinkubiert verwendet. Die Inkubation der iDCs erfolgte für 2 h mit 20 µg/ml Partikel in Medium mit 0%, 10% und 100% HS. Die Auswertung der Proben erfolgte quantitativ mittels Durchflusszytometrie.



Alle drei Partikel weisen in Bezug auf den prozentualen Anteil fluoreszenter Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Vorinkubation mit Citratplasma und der Vorinkubation mit IgG reduziertem Plasma (Abbildung 7 oben) auf. Lediglich bei Betrachtung des Medians der Fluoreszenzintensitäten zeigt PS-NH<sub>2</sub> in 10 % HS einen abnehmenden Trend ( $p < 0,1$ ;  $n = 3$ ) zwischen der IgG reduzierten und der Citratplasma Probe (Abbildung 7 unten). Hierbei sollte beachtet werden, dass der Median der Intensität nicht nur die Aufnahme der Partikel, sondern auch deren Bindung an die Zellmembran widerspiegelt (siehe 3.1.2). In diesem Zusammenhang kann zudem festgestellt werden, dass die starke Schwankung des Medians lediglich bei den unbehandelten nackten Partikeln in 0% HS auftritt. Die Vorinkubation in Citratplasma, also eine im Vorfeld aufgebaute Proteinkorona, zeigt demnach einen Effekt auf die Aufnahme und/oder die Bindung der Partikel. Herauszufinden bleibt, welche Proteine im speziellen involviert sind.

## 3.2 Intrazellulärer Transport der Nanocarrier

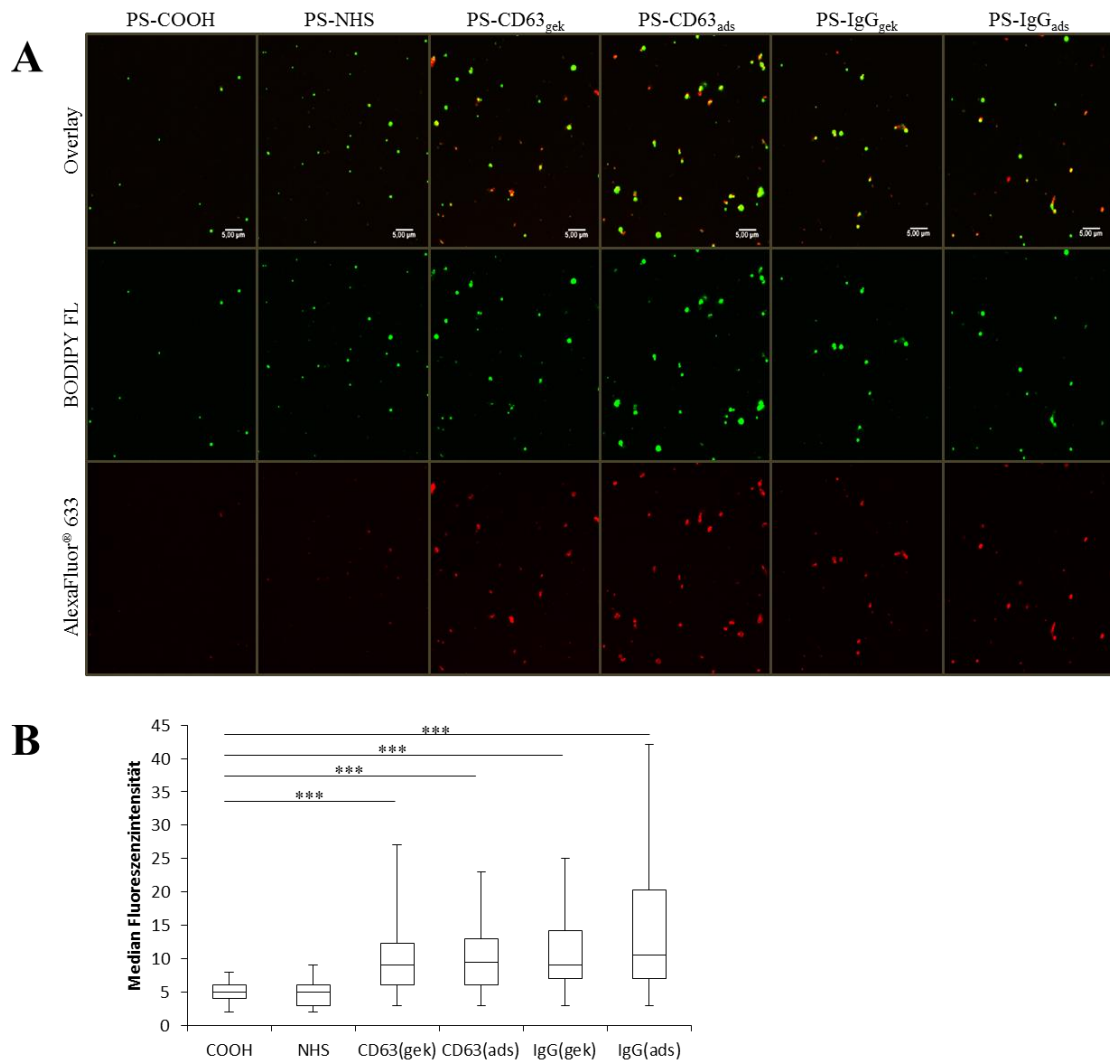
Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des intrazellulären Transports von Nanocarriern. Hierfür war es zunächst nötig eine Methode zu finden, welche die Aufreinigung der Nanocarrier enthaltenden Vesikel ermöglicht. Nach erfolgreicher Aufreinigung könnten dann die Transportvesikel mittels Antikörperfärbung auf spezifische Endozytosemarker im Durchflusszytometer untersucht werden.

### 3.2.1 Polystyrolpartikel mit Eisenoxid

Die Aufreinigung der Carboxy-funktionalisierten Polystyrolpartikel erfolgte unter Ausnutzung der magnetischen Eigenschaft des enthaltenen Eisenoxids. So wurden aus dem Lysat, der zuvor mit den Partikeln behandelten Zellen, unter Nutzung des MACS Systems von Miltenyi lediglich die magnetischen Bestandteile aufgereinigt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht.

### 3.2.1.1 Nachweis der Oberflächenmarkierung

Bevor die Partikel für weitere Versuche verwendet werden konnten, wurde die Funktionalisierung mit Maus IgG beziehungsweise anti CD63 mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. Hierfür erfolgte die Behandlung von 0,4  $\mu\text{g}$  PS-partikel mit 0,05 mg/ml Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 anti-Maus IgG, wobei die Proben mittels cLSM analysiert wurden.



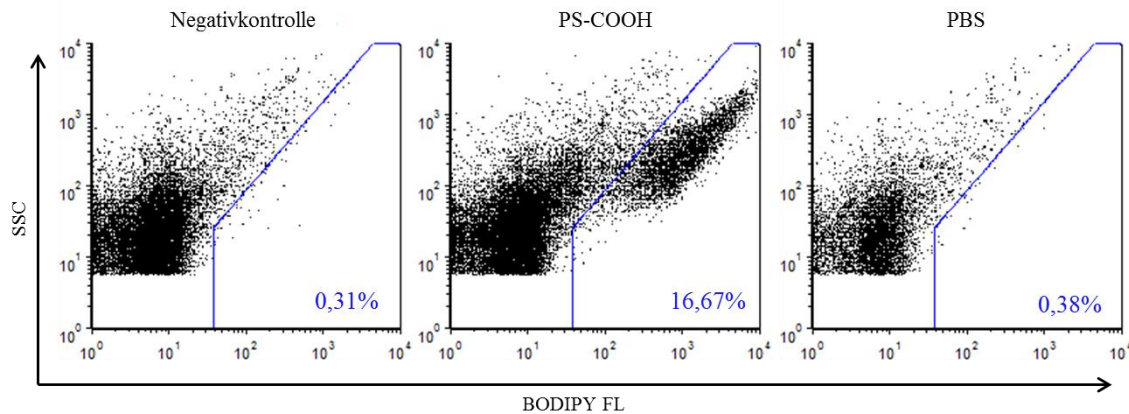
**Abbildung 8: Nachweis von Antikörpern an der Oberfläche magnetischer PS-Partikel.** 0,4  $\mu\text{g}$  Carboxy-funktionalisierte Polystyrolpartikel wurden für 30 min bei RT mit 0,05 mg/ml Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 anti-Maus IgG behandelt. (A) cLSM Aufnahmen der behandelten Partikel. In grün sind die mit BODIPY markierten Partikel und in rot das Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 Signal dargestellt. (B) Auswertung der Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 an 80 verschiedenen Partikelpositionen mittels ImageJ. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Die mit anti CD63 beziehungsweise mit Maus IgG funktionalisierten Partikel zeigen eine starke Fluoreszenzintensität durch den Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 markierten Antikörper

(Abbildung 8A). Im Gegensatz dazu weisen die PS-Partikel, welche lediglich COOH und NHS Gruppen auf ihrer Oberfläche tragen und somit keine spezifischen Bindungsstellen für den Antikörper bieten, ein schwächeres Signal auf. Um den visuellen Eindruck zu quantifizieren wurden 80 zufällig ausgewählte Signale mittels ImageJ ausgewertet. Hierfür erfolgte mit Hilfe des Programms die Definition der Partikelpositionen über das BODIPY-Signal um an diesen definierten Positionen die Fluoreszenzintensitäten der sekundären Antikörper zu analysieren. Dadurch konnte festgestellt werden, dass Nanopartikel mit Antikörpermodifikation ein signifikant höheres Signal als die nackten Kontrollpartikel aufweisen (Abbildung 8B). Auch gibt es zwischen den beiden Kontrollpartikeln keine signifikante Abweichung. Demnach hat die Modifizierung der Oberfläche mit dem NHS Ester keine Erhöhung der unspezifischen Bindung des Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 Antikörpers zur Folge. So zeigen auch die beiden Variationen der mit anti CD63 funktionalisierten Partikel und PS-IgG<sub>gek</sub> ein ähnliches Signal, was auf eine gleich starke Beladung der Oberfläche mit Antikörper schließen lässt. Lediglich beim Partikel mit adsorbiertem IgG wurden abweichend höhere Intensitäten ermittelt. Ob dies mit einer dichteren Beladung der Oberfläche mit IgG zusammenhängt kann jedoch anhand dieser Ergebnisse nur spekuliert werden.

### 3.2.1.2 PS-COOH enthaltende Vesikel

Um eine möglichst effiziente Aufnahme zu gewährleisten und somit eine gute Ausbeute an NC enthaltenden Vesikeln, wurde mit 150 µg/ml eine hohe Konzentration an Partikeln gewählt. Über einen im Vorfeld durchgeführten Zytotoxizitätstest mittels PI Färbung konnte nach 24 h Inkubation der Partikel keine Zytotoxizität für iDCs festgestellt werden (unveröffentlichte Daten, Manuel Tonigold, MPIP). Nach 2 h Inkubation der iDCs mit 150 µg/ml PS-COOH unter Standardbedingungen erfolgte die mechanische Lyse der Zellen mit Hilfe einer 27G Kanüle und die magnetische Aufreinigung der Partikel enthaltenden Bestandteile des Lysats über µMACS Säulen. Als Negativkontrolle diente hierbei PBS und das Lysat unbehandelter Zellen, welches ebenfalls über eine µMACS Säule aufgereinigt wurde.

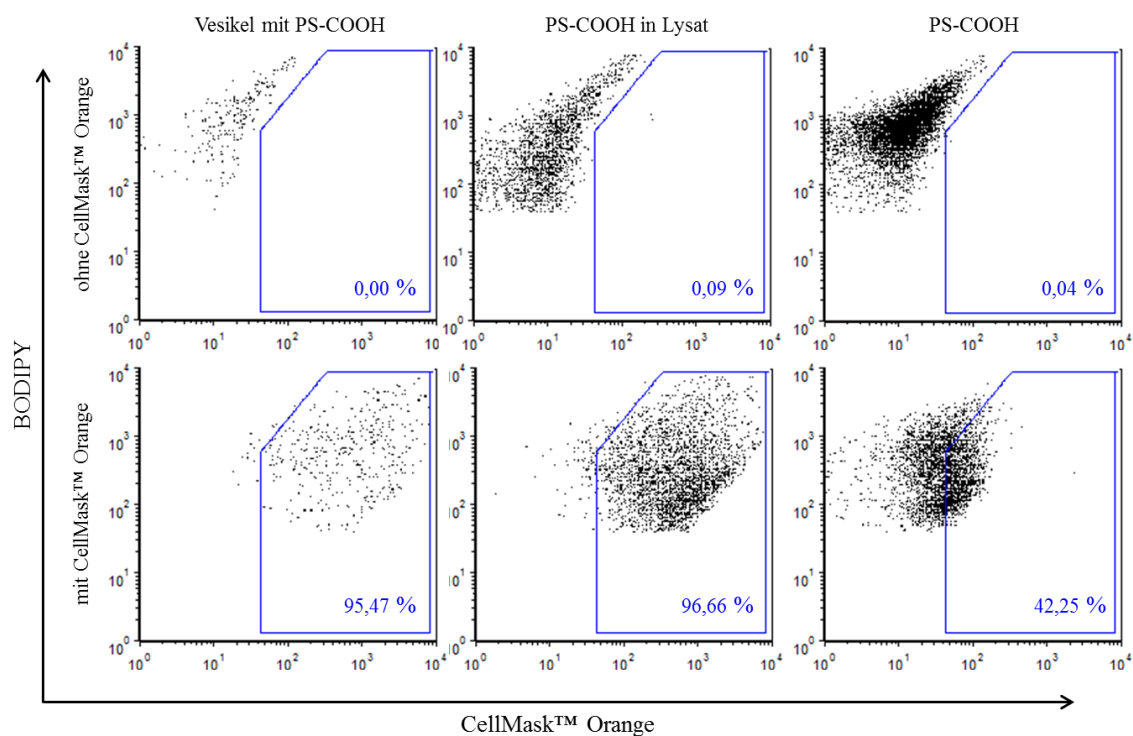


**Abbildung 9: PS-COOH enthaltende Vesikel im Durchflusszytometer.** IDCs wurden nach 2h Inkubation mit 150  $\mu\text{g/ml}$  PS-COOH lysiert und die PS-COOH enthaltenden Vesikel über  $\mu\text{MACS}$  Säulen aufgereinigt. Die Abgrenzung der BODIPY positiven Events (blaues Gate) erfolgte anhand der Negativkontrollen.

Bei der Messung des magnetisch aufgereinigten Lysats zeigte sich eine auf BODIPY positive Population, welche sich gut von den restlichen nicht fluoreszenten Events abgrenzen lässt (Abbildung 9). Da es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um Vesikel handelt, welche Nanopartikel umhüllen, ist die Aufreinigung der von der Zelle aufgenommenen Partikel über die  $\mu\text{MACS}$  erfolgreich verlaufen. Zu klären bleibt, ob die Vesikel noch intakt sind, da die Vesikelmembran beim Säulendurchlauf oder beim Zellaufschluss zerstört oder beschädigt werden könnte.

### 3.2.1.3 Nachweis der Vesikelmembran mit CellMask™ Orange

Um zu prüfen ob die Vesikelmembran nach der magnetischen Aufreinigung die Partikel noch umschließt, wurde diese nach der Aufreinigung über CellMask™ Orange angefärbt und die Proben im Durchflusszytometer gemessen. Hierfür erfolgte nach 2 h Inkubation der iDCs mit 150  $\mu\text{g/ml}$  PS-COOH die mechanische Lyse der Zellen über eine 27G Kanüle und die magnetische Aufreinigung der Vesikel mit Hilfe der  $\mu\text{MACS}$  Säulen. Durch die Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  CellMask™ Orange zu den Proben wurde die Membran markiert. Vesikel welche PS-COOH enthalten, sollten daher sowohl das BODIPY Signal der Partikel, als auch das CellMask™ Orange Signal der angefärbten Vesikelmembran aufweisen. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte PS-COOH und in Zelllysat vorinkubierte Partikel eingesetzt.



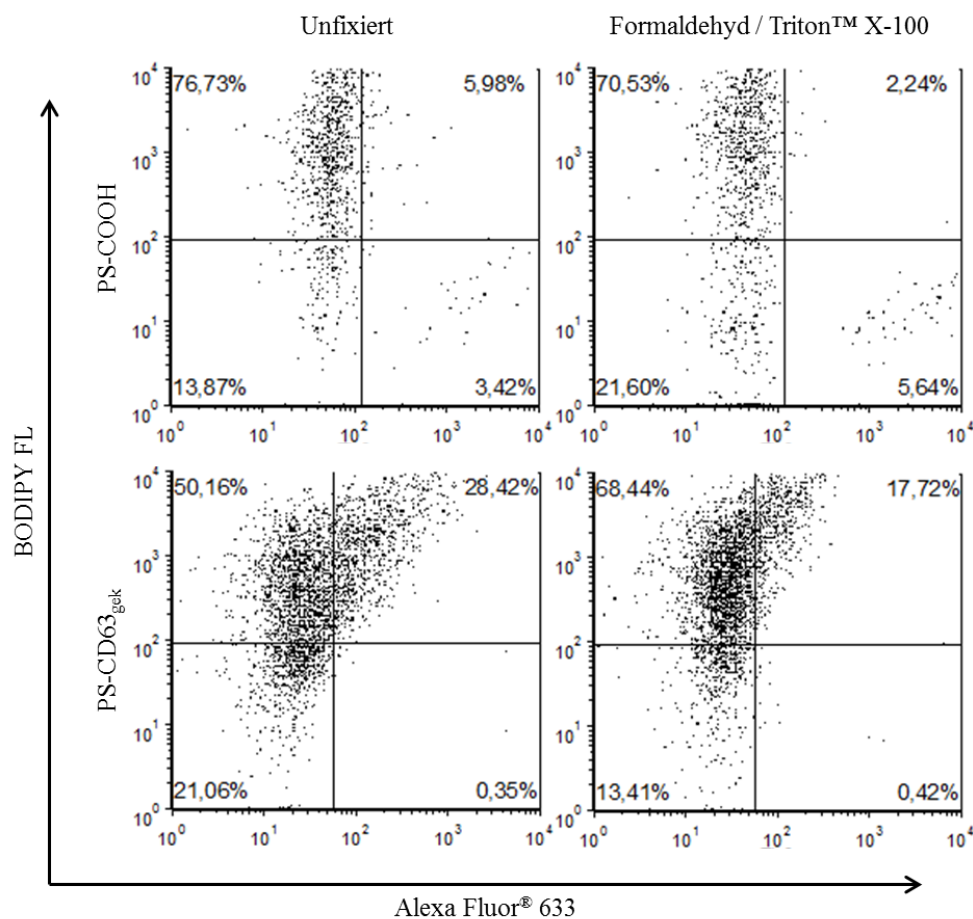
**Abbildung 10: Nachweis der Vesikelmembran nach magnetischer Aufreinigung über  $\mu$ MACS.** IDCs wurden nach 2h Inkubation mit 150  $\mu\text{g/ml}$  PS-COOH lysiert und die Partikel enthaltenden Vesikel über  $\mu$ MACS Säulen aufgereinigt. Kurz vor der Messung im Durchflusszytometer erfolgte die Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  CellMask™ Orange zu den Proben. Die Abgrenzung der CellMask™ Orange positiven Events (blaues Gate) erfolgte anhand der Negativkontrollen ohne den Membranfarbstoff.

Die Probe mit Vesikeln zeigt ebenso wie die im Lysat vorinkubierten PS-COOH Partikel eine starke Kolokalisation von 95,47% bzw. 96,66% zwischen BODIPY und CellMask™ Orange (Abbildung 10). Die unbehandelten PS-COOH Partikel hingegen weisen ein deutlich schwächeres CellMask™ Orange Signal auf (42,25%). Demnach bewirkt die Adsorption von Zelllysat an die Partikel ebenso wie die wahrscheinlich vorhandene Vesikelmembran eine Anlagerung des Farbstoffs. Ein Aufreißen der Vesikelmembran aufgrund der Aufreinigung und infolge dessen die Freisetzung der Partikel wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung für die ähnlichen Signale. Ohne eine Positivkontrolle, also ein intaktes Vesikel, ist eine entgültige Auswertung dieses Versuchs nicht möglich.

#### 3.2.1.4 Nachweis der Unversehrtheit der Vesikelmembran mittels Antikörper

Um nachweisen zu können ob die Vesikelmembran nach der magnetischen Aufreinigung noch intakt ist, wurden PS-COOH und PS-CD63<sub>gek</sub> Partikel verwendet. Über die

Zugänglichkeit von anti CD63 kann indirekt die Unversehrtheit der Membran getestet werden, da Antikörper eine intakte Vesikelmembran nicht überwinden können. Hierfür erfolgte nach 2 h Inkubation der iDCs mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Partikel die mechanische Lyse der Zellen über eine 27G Kanüle und die magnetische Aufreinigung der Vesikel mit Hilfe der  $\mu\text{MACS}$  Säulen. Daraufhin konnte unter Verwendung von 4  $\mu\text{g/ml}$  Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 markiertem anti Maus IgG getestet werden, ob anti CD63 an der Oberfläche der Nanopartikel für den Antikörper zugänglich ist. Die quantitative Analyse der Kolo-kalisation von Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 und dem BODIPY Signal der Partikel erfolgte mittels Durchflusszytometrie. PS-COOH enthaltende Vesikel fungierten als Negativkontrolle und mit 5% FA und 0,25% Triton<sup>™</sup> X-100 fixierte Proben als Positivkontrolle.

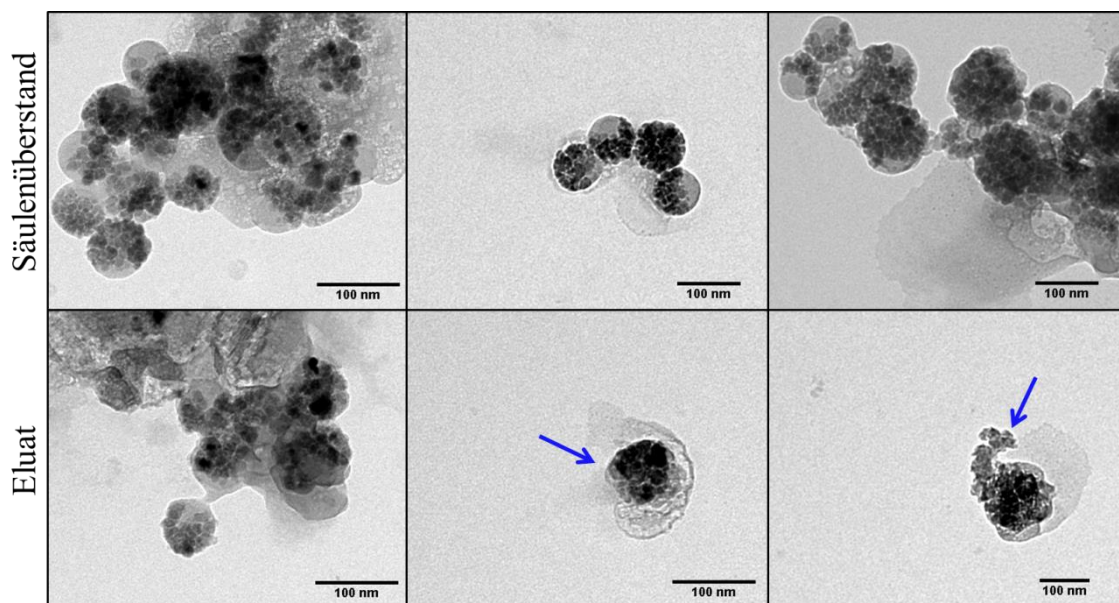


**Abbildung 11: Untersuchung der Unversehrtheit der Vesikelmembran nach magnetischer Aufreinigung über  $\mu\text{MACS}$ .** iDCs wurden nach 2h Inkubation mit 150  $\mu\text{g/ml}$  PS-COOH, beziehungsweise PS-CD63<sub>gek</sub>, lysiert und die Partikel enthaltenden Vesikel über  $\mu\text{MACS}$  Säulen aufgereinigt. Für eine Hälfte der jeweiligen Eluatproben erfolgte eine Fixierung mit 5% FA und 0,25% Triton<sup>™</sup> X-100, während die andere Hälfte unfixiert blieb. Sowohl die fixierten, als auch die unfixierten Proben wurden im Anschluss mit 4  $\mu\text{g/ml}$  Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 markiertem anti-Maus IgG für 30 min inkubiert.

Sowohl die fixierte, als auch die unfixierte PS-CD63<sub>gek</sub> Probe weisen eine Kolokalisation von BODIPY und Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 auf (Abbildung 11). So ist beim nackten Partikel mit 5,98% (unfixiert) und 2,24 % (fixiert) ein schwaches unspezifisches Kolokalisationssignal und zusätzlich im unteren, rechten Teil freier Antikörper ersichtlich (unfixiert 3,42 und fixiert 5,64 %). Im Gegensatz dazu kommt es bei den funktionalisierten Partikeln sowohl bei der fixierten, als auch bei der unfixierten Probe zu einer Deckung der beiden Signale zu 17,72 % bzw. 28,42 %. Wobei die auf Alexa Fluor 633 positive Population des freien Antikörpers bei beiden Proben fehlt. Demnach war die Partikeloberfläche auch ohne Fixierung für den Antikörper zugänglich, also die Membran der Vesikel nicht mehr intakt.

### 3.2.1.5 PS-COOH enthaltende Vesikel im TEM

Die Untersuchung des Säulenüberstandes und des Eluates mittels TEM soll einerseits Aufschluss darüber geben ob die meisten von den iDCs aufgenommenen Partikel auch tatsächlich die Säule passieren und andererseits den Zustand der Partikel nach Säulendurchlauf dokumentieren. Da für die TEM Aufnahmen eine wesentlich höhere Konzentration der NP enthaltenden Vesikel nötig ist als für die Durchflusszytometrie, erfolgte dieser Versuch unter Verwendung von drei Millionen iDCs, welche mit 150 µg/ml PS-COOH für 2 h inkubiert wurden.



**Abbildung 12: PS-COOH nach magnetischer Aufreinigung über µMACS im TEM.** IDCs wurden nach 2h Inkubation mit 150 µg/ml PS-COOH lysiert und die Partikel enthaltenden Vesikel über µMACS Säulen aufgereinigt und anschließend mittels TEM analysiert.

Die TEM Aufnahmen zeigen, dass sich sowohl im Eluat, als auch im Überstand Partikel befinden (Abbildung 12). Somit konnten nicht alle von den Zellen aufgenommenen Partikel die Säule passieren, wodurch ein Teil der Probe verloren geht und eventuell eine Selektion z.B. nach der Größe der Vesikel stattfinden könnte. Desweiteren erscheinen die Partikel im Eluat teilweise beschädigt, da die eigentlich runde Form weniger scharf erkennbar oder sogar gebrochen ist (Abbildung 12, blaue Pfeile).

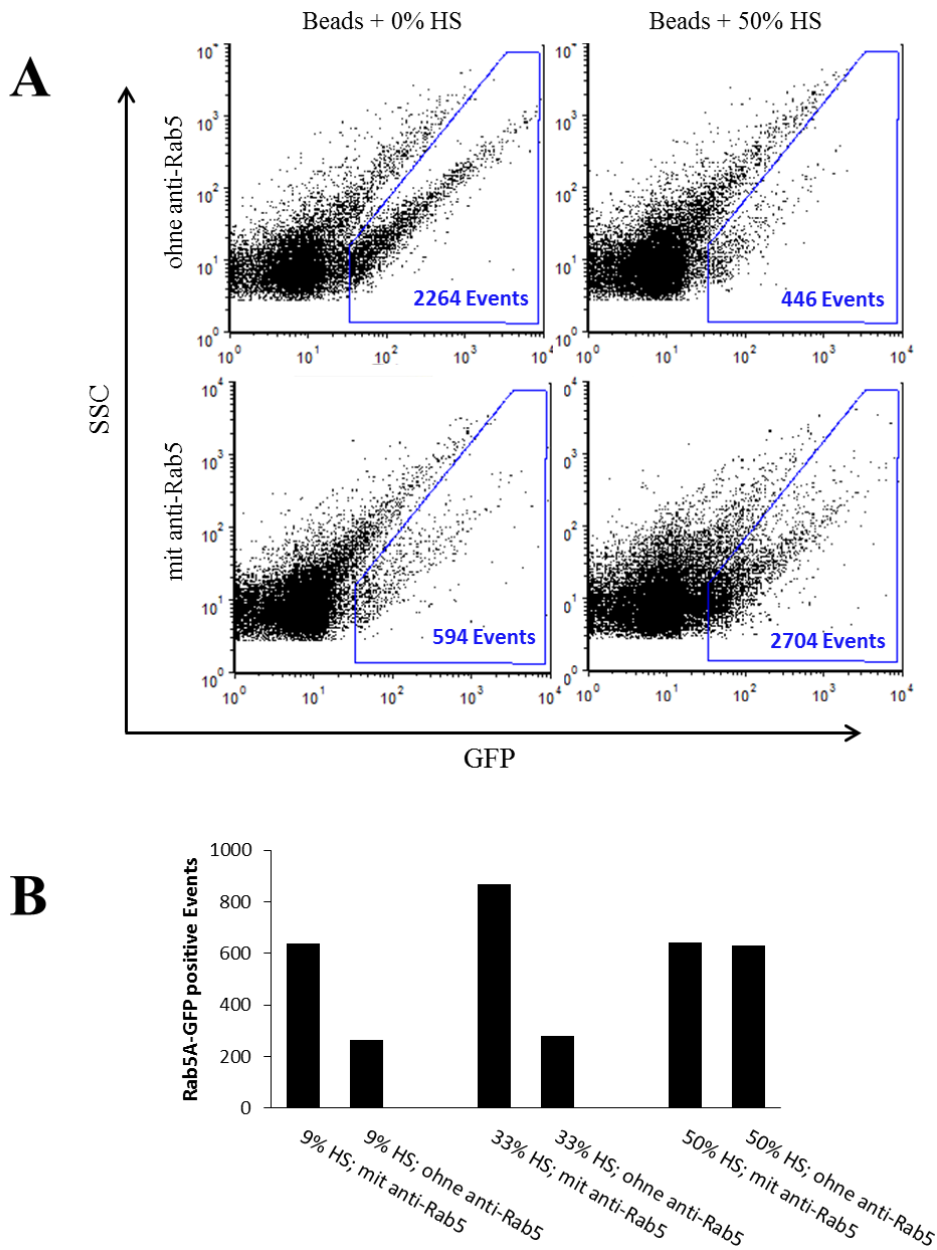
### 3.2.2 Kopplung der Vesikel an magnetische Beads

Um auch die Charakterisierung der Transportvesikel nicht magnetischer NP zu ermöglichen, wurde untersucht, ob mithilfe der anti Maus IgG MicroBeads eine Aufreinigung von Rab5 positiven Vesikel über die  $\mu$ MACS Säulen möglich ist. Die Markierung der Rab5 positiven Vesikel erfolgte hierbei mittels eines Primärantikörpers gegen Rab5, an welchen wiederum die MicroBeads binden konnten. Durch die Bindung der Beads an die Vesikel können diese über  $\mu$ MACS Säulen aufgereinigt werden. Diese Methode ist nicht nur auf Rab5 positive Endosomen begrenzt, sondern auch auf andere Zellbestandteile mit spezifischen Markerproteinen erweiterbar und könnte somit für die Isolation von Organellen verwendet werden für die bis jetzt noch keine solche Methode zur Verfügung steht. Um eine hohe Ausbeute an Rab5 positiven Vesikeln sicherzustellen, wurden die Versuche mit Caco-2 Zellen, welche Rab5A-GFP konstitutiv überexprimieren, durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Verringerung der unspezifischen Bindung über eine Vorinkubation der magnetischen Beads mit HS

Parallel zur Inkubation des Lysats mit anti Rab5 erfolgte eine Vorbehandlung der Beads mit 9%, 33% und 50% HS für 30 min auf Eis um zu analysieren, ob dadurch unspezifische Bindungen vermindert werden können. Dies war notwendig, da vorherige Ergebnisse unspezifische Bindungen der Beads nachgewiesen hatten. Nachdem das Lysat weitere 30 min mit den Beads inkubiert wurde, erfolgte die Aufreinigung der magnetischen Bestandteile über  $\mu$ MACS Säulen und die Messung des GFP Signals der Rab5 positiven Vesikel im Durchflusszytometer.





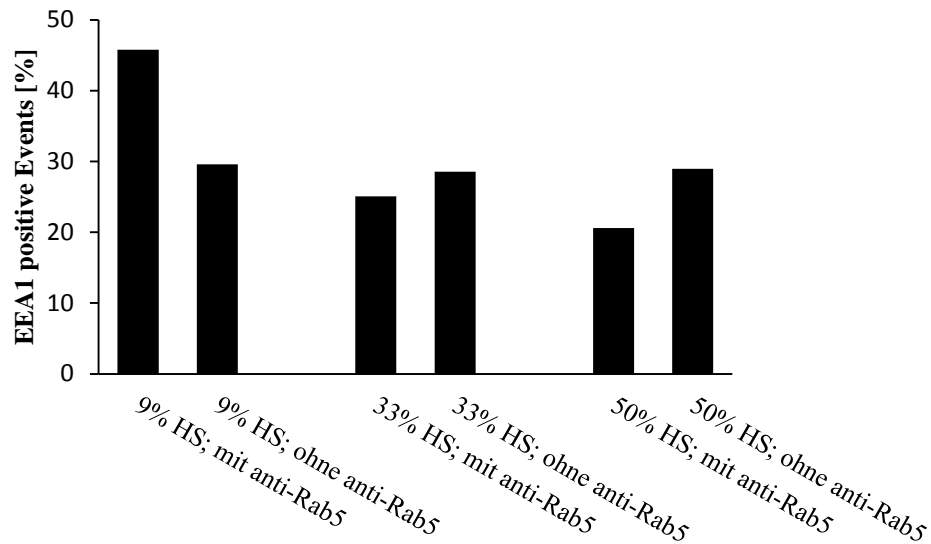
**Abbildung 13: Reduzierung der unspezifischen Bindung über die Vorinkubation der Beads mit HS.** Rab5A-GFP konstitutiv überexprimierende Caco-2 Zellen wurden lysiert und das Lysat mit 1 µg anti Rab5 inkubiert. Nach 30 min wurden in HS vorinkubierte Beads (0, 9, 33, 50% HS) hinzu pipettiert. Als Vergleichsprobe diente Lysat ohne anti Rab5 Markierung. Die Quantitative Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (A) Vorinkubation der Beads in 0 und 50% HS. (B) Vorinkubation der Beads in 9, 33 und 50% HS. Anhand der Messung des verwendeten PBS erfolgte die Abgrenzung der auf GFP positiven Events.

Ohne die Markierung der GFP positiven Vesikel mit anti Rab5 sollten diese nicht an die Beads gebunden und somit auch nicht über die Säulen zurückgehalten werden. In Abbildung 13A ist jedoch ersichtlich, dass auch ohne Antikörper eine Aufreinigung GFP positiver Events stattfindet. Durch die Vorinkubation der Beads mit 50% HS kommt es bei der Probe ohne anti Rab5 zu einer Verringerung der GFP positiven Population (von

2264 Events auf 446 Events) und zu einer ähnlich starken Population bei der Probe mit anti Rab5 Markierung (2704 Events). Demnach verringert die Verwendung von HS die unspezifische Bindung, wobei eine spezifische Bindung der Beads über den Antikörper nach wie vor möglich ist. Ein Vergleich unterschiedlicher HS Konzentrationen sollte zeigen, ob mit geringeren Mengen an HS die Ausbeute an GFP positiven Vesikeln ohne Verlust an Spezifität erhöht werden kann. Die Proben mit 9% und 33% HS weisen hierbei einen größeren Anteil an GFP positiven Events bei der mit anti Rab5 behandelten Lysatprobe im Gegensatz zu deren Pendant ohne anti Rab5 auf (Abbildung 13B). Eine unspezifische Bindung der Vesikel an die Beads, oder möglicherweise auch an die Säulen selbst, lies sich durch die Vorinkubation zwar nicht ganz vermeiden, jedoch ist eine Unterscheidung zwischen Probe und Kontrolle möglich. Die Vorinkubation mit 50% HS zeigt hingegen einen gleichstarken Anteil an GFP positiven Events bei beiden Proben. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass eine Abdeckung der Beads mit einem geringen Proteinenanteil (9-33% HS) einen positiven Effekt auf deren Bindeeigenschaften hat, während zu hohe oder zu niedrige HS Konzentrationen unspezifische Bindungen zu fördern scheinen.

#### 3.2.2.2 Rab5A-GFP kolokalisiert mit EEA1

Die Untersuchung eines mit Rab5 kolokalisiertem Proteins wie EEA1 (Mu, Callaghan et al. 1995, Simonsen, Lippe et al. 1998, Aivazian, Serrano et al. 2006) soll zeigen, dass die Vesikel nach der Aufreinigung weitestgehend unversehrt sind. Für EEA1 wird vermutet, dass es eine wichtige Rolle bei der Fusion von frühen Endosomen spielt, wobei sowohl Rab5, als auch PI(3)P notwendig für die Rekrutierung von EEA1 sind (Rubino, Miaczynska et al. 2000). Eine Markierung von EEA1 sollte demnach mit dem GFP Signal von Rab5 kolokalisieren. Hierfür erfolgte wiederum die Lyse von Rab5A-GFP konstitutiv überexprimierenden Caco-2 Zellen. Das Lysat wurde mit anti Rab5 und mit Beads, welche mit verschiedenen HS Konzentrationen (9, 33, 50% HS) vorbehandelt wurden, inkubiert. Nach der Aufreinigung der magnetisch markierten Bestandteile über die  $\mu$ MACS Säulen wurde 10 ng/ $\mu$ l anti EEA1 zu den Proben pipettiert und für 30 min inkubiert. Die Entfernung von freien Antikörpern vor der Messung der Fluoreszenz am Durchflusszytometer erfolgte über eine erneute Aufreinigung über die  $\mu$ MACS.



**Abbildung 14: Kolokalisation von Rab5A-GFP und EEA1.** Rab5A-GFP konstitutiv überexprimierende Caco-2 Zellen wurden lysiert und das Lysat mit 1 µg anti Rab5 und mit in HS vorbehandelten Beads (9%, 33%, 50% HS) inkubiert. Nach erfolgter Aufreinigung der magnetischen Bestandteile über die µMACS Säulen wurde EEA1 über eine Antikörperfärbung fluoreszenzmarkiert. Die quantitative Auswertung des prozentualen Anteils an EEA1 innerhalb der GFP positiven Events erfolgte mittels Durchflusssytopmetrie.

Im Durchschnitt kolokalisieren 30% der GFP positiven Events mit EEA1 (Abbildung 14). Lediglich die Probe mit anti Rab5 und 9% HS zeigt eine höhere Kolokalisation von 45%. Demnach scheint zumindest ein Teil der aufgereinigten Organelle weitestgehend in Takt zu sein. Um eine genauere Aussage anhand der Kolokalisation treffen zu können, müsste zunächst noch untersucht werden wie stark Rab5 und EEA1 in den verwendeten transfizierten Caco-2 Zellen tatsächlich kolokalisieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Polystyrolpartikel mit *Stealth*-Effekt

Eine der ersten Hürden für NP ist der Weg zum Zielgewebe mit möglichst minimalen unspezifischen Interaktionen. Wobei es weder zur Aggregation der Carrier untereinander, noch mit körpereigenen Strukturen kommen sollte. Die wohl am meisten genutzte Strategie ist die Modifizierung der Nanocarrier Oberfläche mit PEG, einem Polymer aus sich wiederholenden Ethylenether Einheiten (Jokerst, Lobovkina et al. 2011), welches die Hydrophilie an der Oberfläche erhöht. Dadurch wird die Interaktion mit Proteinen des Blutes verringert und die Halbwertszeit der Zirkulation verbessert (Owens and Peppas 2006, Perry, Reuter et al. 2012). Insbesondere die Anlagerung von Opsoninen wie IgG und in Folge dessen die Erkennung durch das Immunsystem ist hierbei von Bedeutung. Während die Stabilität von PEG in wässriger Lösung in erster Linie von Vorteil ist, so wäre bei in vivo Anwendungen eine bioabbaubare Variante der Oberflächenfunktionalisierung wünschenswert. So gibt es sowohl Berichte über die ungewollte Anreicherung, als auch über einen nicht kontrollierbaren oxidativen Abbau in toxische Nebenprodukte (Herold, Keil et al. 1989, Ulbricht, Jordan et al. 2014). Eine potentielle Alternative zu PEG ist P(EtPPn), welches als wasserlöslich, nicht toxisch und vollständig abbaubar beschrieben wurde (Wolf, Steinbach et al. 2015).

#### 4.1.1 Verringerung der Zytotoxizität von PS-Partikeln durch die Funktionalisierung mit P(EtPPn)

Es konnte bewiesen werden, dass die mit P(EtPPn) wie die mit PEG funktionalisierten PS-Partikel auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration (150 µg/ml) nach 24h in iDCs als nicht toxisch einzustufen sind. Im Gegensatz dazu zeigt der PS-Partikel ohne P(EtPPn) oder PEG eine beginnende Zytotoxizität ab 37,5 µg/ml (siehe 3.1.1). Demnach kann geschlussfolgert werden, dass P(EtPPn) genau wie PEG einen enormen Einfluss auf die Biokompatibilität von Nanocarriersystemen hat und der zytotoxische Effekt der unmodifizierten PS-Partikel durch das P(EtPPn) abgeschirmt werden kann. Zuvor von Wolf et al. durchgeführte Versuche mit HeLa Zellen, welche für 24h mit dem Polymer inkubiert wurden, unterstützen diese Ergebnisse. Hierbei konnte auch für hohe

Konzentrationen von bis zu 1 mg/ml Polyphosphonaten ohne Carriersystem kein toxischer Effekt festgestellt werden (Wolf, Steinbach et al. 2015).

#### 4.1.2 Modifikation der PS-Partikel mit P(EtPPn) bewirkt *Stealth*-Effekt

In Bezug auf den *Stealth*-Effekt konnte gezeigt werden, dass P(EtPPn) einen ähnlichen Effekt auf die Aufnahme in iDCs aufweist wie eine Funktionalisierung mit PEG. So sinkt der Anteil der BODIPY positiven Zellen um bis zu 85% bei der Inkubation der Zellen mit PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> in 100% HS. Im Vergleich dazu geht die Aufnahme der PEGylierten Partikel um bis zu 95% und die der Nackten lediglich um 30% zurück (Abbildung 5B). Der Anteil der BODIPY positiven Zellen im Medium ohne HS war hierbei für alle drei Partikel einheitlich bei etwa 100%, erst durch die Zugabe von HS zeigt sich der Effekt der verschiedenen Funktionalisierungen. Auch der Unterschied zwischen 10% HS und 100% HS, welcher besonders bei der PEGylierten Form deutlich wird, ist ein Hinweis dafür, dass die Verringerung der Aufnahme im direkten Zusammenhang mit der Proteinkonzentration im umgebenden Medium steht. Die Unterschiede zwischen den funktionalisierten und den nackten PS-NH<sub>2</sub> Partikeln dürften also in der Zusammensetzung der Proteinkorona zu finden sein, worin auch das steigende Interesse an der Aufschlüsselung dieser begründet ist (Pearson, Juettner et al. 2014, Ritz, Schöttler et al. 2015). Ritz et al. wiesen bereits bestimmten Serumproteinen einen Dysopsonin beziehungsweise Opsonin Charakter zu, so führte eine Vorbehandlung der Partikel mit den Apolipoproteinen ApoA4 und ApoC3 zu einer Verringerung der zellulären Aufnahme (in hMSCs), während ApoH diese erhöhte. Da PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> ebenso wie die PEGylierten Partikel die Aufnahme reduzieren, könnte bei einer genaueren Untersuchung der Proteinkorona mögliche Gemeinsamkeiten beziehungsweise gemeinsame Unterschiede zur Korona von PS-NH<sub>2</sub> weiteren Aufschluss geben und mögliche Interaktionspartner für die Zell-Partikel Interaktion identifizieren.

#### 4.1.3 Proteinkorona der PS-Partikel mit P(EtPPn)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass in der harten Proteinkorona von PS-NH<sub>2</sub>-P(EtPPn)<sub>46</sub> und PS-NH<sub>2</sub>-PEG der Proteinanteil von IgG um 70-90% geringer ist als bei PS-NH<sub>2</sub> (Abbildung 6B). Die Anlagerung von Opsoninen wie IgG an die Partikel beeinflusst deren Erkennung durch das Immunsystem und in Folge dessen die Aufnahme durch phagozytierende Zellen, wie die hier verwendeten iDCs. Ein Zusammenhang

zwischen dem geringeren Anteil an IgG und der verringerten Aufnahme in iDCs wäre demnach eine logische Schlussfolgerung. Jedoch konnte über eine Vorinkubation der NP mit IgG reduziertem Citratplasma und somit die Erzeugung einer IgG ärmeren Proteinkorona, kein signifikanter Effekt erzielt werden. Lediglich beim nackten Partikel in 10% HS zeichnete sich bei Betrachtung der Fluoreszenzintensität ein abnehmender Trend zwischen der Vorinkubation mit IgG reduziertem Citratplasma und der Vorinkubation mit Citratplasma ab (Abbildung 7). Da bei diesen Partikeln die Fluoreszenzintensität nicht nur die aufgenommenen, sondern auch die an der Membran gebundenen Partikel widerspiegelt (siehe 3.1.2), kann die geringere Intensität durch die Verwendung von IgG reduziertem Citratplasma als Verringerung der Bindung der Partikel an die Zellmembran, oder auch als eine Verringerung der Aggregation der Partikel untereinander, interpretiert werden. Da der Effekt eher gering ist, könnte auch daran liegen, dass das verwendete Plasma zwar einen reduzierten IgG Anteil von 4-5% (ursprünglich 30%) hat, jedoch noch immer IgG enthält. Es sind weitere Untersuchungen notwendig um zu klären, inwieweit sich die Zusammensetzung der Proteinkoronen der funktionalisierten zu den der PS-NH<sub>2</sub> Partikel unterscheiden und welche Proteine ausschlaggebend für die unterschiedliche Aufnahme der Partikel sind. So gibt es noch weitere vielversprechende Proteine wie Clusterin, Albumin oder Apolipoproteine, die häufig in der harten Proteinkorona von NP vorkommen und bereits über Massenspektrometrie identifiziert wurden (Tenzer, Docter et al. 2013, Ritz, Schöttler et al. 2015).

## 4.2 Magnetische NP enthaltende Vesikel und deren Aufreinigung über $\mu$ MACS

Das Verständnis des Mechanismus hinter der zellulären Aufnahme von NP und deren intrazellulärer Weitertransport ist essenziell um mehr über das finale Schicksal der Carrier in Erfahrung zu bringen. So wurde auch schon für eine Vielzahl von Partikeln die beteiligten Aufnahme- und Transportprozesse mit Hilfe von Inhibitoren, Kolo-kalisationen mit spezifischen Endozytosemarkern, oder auch genetisch modifizierten Zellen untersucht (Zhao, Zhao et al. 2011, Treuel, Jiang et al. 2013). Um auch quantitativ eine Aussage mittels Durchflusszytometrie treffen zu können müssten die NC enthaltenden Transportvesikel zunächst aufgereinigt werden. Anschließend wäre es möglich über spezifische Marker wie Rab5 (frühe Endosomen) oder Rab7 (späte Endosomen) die Vesikel näher zu charakterisieren, oder auch die proteomische Veränderung solcher

Endosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Partikelinkubation zu dokumentieren (Rink, Ghigo et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung der Vesikel unter Ausnutzung der magnetischen Eigenschaften von Eisenoxid enthaltenden PS-Partikeln über  $\mu$ MACS Säulen von Miltenyi. Bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie lassen sich die fluoreszenzmarkierten Partikel gut von den nicht fluoreszenten Events abgrenzen (Abbildung 9), eine gute Voraussetzung für Kollokalisationsexperimente. Um eine hohe Aussagekraft der Methode zu gewährleisten ist es wichtig nachzuweisen, dass die Vesikel durch den Aufreinigungsprozess unversehrt bleiben.

#### 4.2.1 Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung

Die durchgeführte cLSM Untersuchung der mit Sekundärantikörper behandelten Partikel zeigte, dass zum einen die mit Antikörper funktionalisierten Partikel auf diese Art und Weise markiert und detektiert werden können und zum anderen, dass das un-funktionalisierte Pendant als Negativkontrolle fungieren kann (Abbildung 8A). Anhand der Werte der ImageJ Auswertung (Abbildung 8B) ist zudem ersichtlich, dass das deutlichste Signal bei der Markierung von PS-IgG<sub>ads</sub> auftritt. Nichtsdestotrotz wurde PS-CD63<sub>gek</sub> aufgrund der funktionell interessanteren Modifikation für die weiteren Versuche verwendet. So wird bei Tetraspaninen wie CD63 vermutet, dass sie den Transport der Interaktionspartner regulieren und bei der Antigenprozessierung und -präsentation in iDCs eine Rolle spielen (Engering and Pieters 2001, Mantegazza, Barrio et al. 2004, Pols and Klumperman 2009). Demnach bietet die Funktionalisierung der Nanocarrier mit anti CD63 die Möglichkeit eine Erhöhung der spezifischen Aufnahme in iDCs zu erreichen.

#### 4.2.2 Nachweis der Vesikelmembran und deren Unversehrtheit

Mittels CellMask™ Orange, welches standardmäßig als unspezifischer Farbstoff für die Membran von Zellen verwendet wird, sollte die Partikel umschließende Vesikelmembran nach erfolgter Aufreinigung nachgewiesen werden. Jedoch bewirkte bereits eine Vorinkubation der Partikel in Lysat ein ähnliches Kollokalisationsignal zwischen BODIPY und CellMask™ Orange wie bei den über  $\mu$ MACS aufgereinigten Vesikeln (Abbildung 10). Demnach scheint die Adsorption von Bestandteilen des Lysats an die Partikel ausreichend für die vermehrte Anlagerung des Membranfarbstoffs zu sein. Da eine Unterscheidung der im Lysat vorinkubierten Partikel und der tatsächlich aus dem

Zellysat aufgereinigten Partikel enthaltenden Vesikel mit Hilfe dieser Methode nicht möglich ist, waren weitere Untersuchungen notwendig um die Partikel umschließende Membran und letztlich auch deren Unversehrtheit nachzuweisen.

So sollte die Funktionalisierung von PS-CD63<sub>gek</sub> einen Nachweis der Intaktheit der Vesikelmembran über eine Markierung von anti CD63 mit einem Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ermöglichen. Die spezifische Bindung kann hierbei nur erfolgen wenn der Antikörper zugänglich ist, also die Membran beschädigt beziehungsweise nicht mehr vorhanden ist, oder zuvor über eine Fixierung durchlässig gemacht wurde. Der Versuch konnte jedoch keinen Aufschluss darüber geben ob die Vesikel unversehrt sind, da sowohl fixierte, als auch unfixierte PS-CD63<sub>gek</sub> Proben eine Kolokalisation mit dem BODIPY Signal der Partikel und dem AlexaFluor<sup>®</sup> 633 Signals des Sekundärantikörpers aufwiesen (Abbildung 11). Demnach ist auch ohne eine Behandlung mit Triton<sup>™</sup>X-100 die Partikeloberfläche für den Antikörper zugänglich. Da nicht alle PS-CD63<sub>gek</sub> Events eine Kolokalisation zeigen, könnte geschlussfolgert werden, dass zumindest ein Teil der Vesikel unversehrt geblieben ist, jedoch zeigt auch die fixierte Kontrollprobe keine hundertprozentige Deckung beider Signale. Zum einen liegt dies daran, dass die Abgrenzung zwischen AlexaFluor<sup>®</sup> 633 positiven und negativen Events nicht eindeutig möglich ist und somit positive Events unterhalb der Nachweisgrenze liegen könnten. Zum anderen wäre es möglich, dass bereits alle Sekundärantikörper gebunden vorliegen. Abbildung 11 stützt diese Vermutung, da bei den Negativkontrollen mit PS-COOH im rechten unteren Quadranten kleine Populationen an AlexaFluor<sup>®</sup> 633 positiver Events (3,42% und 5,64%) ersichtlich sind, welche den freien Sekundärantikörpern entsprechen. Diese Populationen sind bei PS-CD63<sub>gek</sub> nicht mehr detektierbar und somit in den Proben wahrscheinlich nicht mehr vorhanden. Auch die Untersuchung der aufgereinigten Partikel enthaltenden Vesikel mittels TEM (Patricia Renz, MPIP) lässt eher auf eine Beschädigung der Vesikel schließen. Zwar ist ohne eine Kontrastierung der Probe mit z.B. Uranylacetat die Membran nicht darstellbar (De Carlo and Harris 2011), jedoch scheint die Struktur der Partikel durch die Aufreinigungsmethode in Mitleidenschaft gezogen worden zu sein (Abbildung 12, blaue Pfeile). Des Weiteren konnten durch TEM Aufnahmen auf der Säule liegen gebliebene Partikel nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass ein Teil der Partikel zurückgehalten wird. Wie groß dieser Verlust an Proben ist und ob durch die Aufreinigung Vesikel selektioniert werden, muss noch weiter untersucht werden.



#### 4.2.3 Modifizierung mit CD63 zeigt Aufnahme verbessernden Effekt

Bei der Auswertung der Versuche konnte festgestellt werden, dass dreimal mehr Vesikel bei den Proben mit PS-CD63<sub>gek</sub> als bei PS-COOH aufgereinigt und im Durchflusszytometer gemessen wurden (Daten nicht gezeigt). Da die Aufreinigung auf der magnetischen Eigenschaft der Partikel beruht, kann geschlussfolgert werden, dass die Funktionalisierung mit anti CD63 die Aufnahme der Partikel in iDCs positiv beeinflusst. Diese Feststellung wird von Aufnahmeuntersuchungen am cLSM und mittels Durchflusszytometrie, durchgeführt von Manuel Tonigold (MPIP, unveröffentlichte Daten), unterstützt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Modifikation mit anti CD63 eine höhere Aufnahme in iDCs bewirkt. Auch die bereits vermutete regulatorische Funktion von CD63 auf den Transport der Interaktionspartner, aufgrund dessen Lokalisation in der Zelle, steht im Einklang mit dieser Beobachtung (Engering and Pieters 2001, Pols and Klumperman 2009). So ist CD63 hauptsächlich im Zellinneren von iDCs angereichert, wobei MHC-II Moleküle in Endo- und Lysosomen vorwiegend mit CD63 assoziiert sind. An der Zelloberfläche hingegen bilden andere Tetraspanine Komplexe mit MHC-II Molekülen und CD63 macht eher einen geringen Anteil aus (Engering and Pieters 2001, Pols and Klumperman 2009).

#### 4.3 Vesikelaufreinigung mit Hilfe magnetischer Beads

Damit die Vesikelaufreinigung über die  $\mu$ MACS Säulen nicht nur auf magnetische NC beschränkt ist, wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob über kommerziell erhältliche magnetische Beads das Verfahren erweiterbar ist. Die hierfür verwendeten Anti-Maus IgG MicroBeads ermöglichen eine spezifische Aufreinigung von Zellen, Zellkompartimenten oder von Organellen über Antikörper. Diese Methode wäre demnach nicht auf die hier untersuchten Rab5 positiven Vesikel begrenzt, sondern auch auf andere Zellbestandteile mit einer spezifischen und klar definierten Proteinexpression an der Oberfläche, für die es bisher keine solche Art der Aufreinigung gibt, erweiterbar. Neben den Anti-Maus IgG MicroBeads wurden auch ProteinG gekoppelte MicroBeads getestet. Die Kopplung der Zielstruktur erfolgt hierbei ebenfalls über Antikörper, da Protein G an die Fc Region von Antikörpern bindet. Dabei kann die Affinität zwischen unterschiedlichen Spezies und zwischen den Antikörperklassen variieren. Da in Vorversuchen die Verwendung der Anti-Maus IgG MicroBeads reproduzierbarere Ergebnisse

lieferte, wurde sich im Rahmen dieser Masterarbeit auf deren weitere Untersuchung festgelegt. Um eine hohe Ausbeute an Rab5 positiven Vesikeln sicherzustellen, wurden für die Versuche Rab5A-GFP konstitutiv überexprimierenden Caco-2 Zellen verwendet.

#### 4.3.1 Unspezifische Bindungen verhindern eine ausreichende Aufreinigung der Vesikel

Die Vorbehandlung der Beads mit 9% und 33% HS, bewirkte bei den mit anti Rab5 behandelten Lysatproben mehr GFP positive Events, als bei der jeweiligen Kontrolle ohne anti Rab5 (Abbildung 13B). Demnach ist eine Unterscheidung zwischen Kontrolle und Probe und somit eine Auswertung der Daten durchaus möglich. Jedoch konnte die Vorinkubation mit HS die unspezifische Bindung der Vesikel an die Beads, oder möglicherweise auch an die Säulen selbst, nicht gänzlich vermeiden. Auch eine höhere Proteinkonzentration bei der Vorinkubation führt nicht zur Erhöhung der Spezifität. So zeigt die Vorinkubation der Beads in 50% HS einen gleichstarken Anteil an GFP positiven Events sowohl bei der Probe, als auch bei der Kontrolle (Abbildung 13B). Insgesamt lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass eine Abdeckung der Beads mit einem geringen Proteinenanteil (9-33% HS) einen positiven Effekt auf deren Bindeeigenschaften hat, während zu hohe oder zu niedrige HS Konzentrationen unspezifische Bindungen zu fördern scheinen.

#### 4.3.2 Kolokalisation von Rab5A-GFP und EEA1

Bei Betrachtung der GFP positiven Events konnte festgestellt werden, dass durchschnittlich 30% mit EEA1 kolokalisieren (Abbildung 14). Ausgehend davon, dass die Intaktheit der Organelle Voraussetzung für eine Kolokalisation ist, wäre dieses Ergebnis ein erstes Indiz für die Unversehrtheit der Membran. Um eine genauere Aussage anhand der Kolokalisation treffen zu können, müsste zunächst untersucht werden wie stark Rab5 und EEA1 in den verwendeten transfizierten Caco-2 Zellen tatsächlich kolokalisieren.

## 5 Fazit und Ausblick

Die Weiterentwicklung und Etablierung von Nanocarriern und deren Oberflächenfunktionalisierungen für die Anwendung im lebenden Organismus birgt immer wieder neue Herausforderungen. Einmal in den Blutkreislauf injiziert, soll der Carrier möglichst gezielt und mit möglichst wenigen pharmakokinetischen Nebeneffekten am Ort seiner Bestimmung ankommen. Das erste Hindernis bildet das körpereigene Immunsystem, dessen phagozytierende Zellen die körperfremden Partikel sehr schnell aus dem Blutstrom entfernen. Die Anlagerung von Serumproteinen mit Opsonincharakter wie IgG an der Oberfläche der Carrier unterstützt hierbei die Identifizierung durch die Immunzellen. Über eine Modifizierung der NC mit Polymeren wie PEG, welche der Proteinanlagerung entgegenwirken, kann die Proteinadsorption zwar nicht komplett verhindert, jedoch die Zirkulationszeit der Carrier im Blutkreislauf deutlich erhöht werden. Mit P(EtPPn) sollte in diesem Zusammenhang eine bioabbaubare Alternative zu PEG untersucht werden. Die Modifizierung von PS-Partikeln mit P(EtPPn) führte zu einer stark verringerten Aufnahme durch iDCs in Anwesenheit von 100% HS *in vitro*, wobei die Effizienz mit der von PEG vergleichbar ist. Ohne Proteine im umgebenden Medium blieb der Effekt jedoch aus. Demzufolge kommt es nicht darauf an eine Anlagerung von Proteinen gänzlich zu verhindern. Die verringerte Aufnahme könnte in der verminderten Anlagerung von Opsoninen und im Gegenzug dem höheren Anteil an Dysopsoninen begründet sein. Die Analyse der Proteinkorona zeigte, dass humanes IgG vermindert an die beiden modifizierten Partikel bindet. Dennoch bewirkte eine Vorinkubation mit IgG reduziertem Plasma keine signifikante Veränderung auf die Aufnahme in iDCs. Die genauere Funktionsweise von P(EtPPn) muss noch eingehender untersucht werden. Das mit PEG vergleichbare Verhalten hinsichtlich der Proteinkorona und der Aufnahme in iDCs, ist aber ein starkes Indiz dafür, dass die bioabbaubare Modifikation vielversprechend für *in vivo* Anwendungen ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Wirkung des Carriers nach Erreichen des Zielgewebes beziehungsweise der Zielzellen. Eng damit verbunden ist das Schicksal des NCs innerhalb einer Zelle, so kann der Abbau oder das aktive Ausschleusen des beladenen Wirkstoffs aus der Zelle großen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Therapie haben. Die Frage ist also welchen Transportweg der Carrier einschlägt und ob darüber eine effektive Wirkung erzielt werden kann. Ziel ist es daher eine einfache und quantitativ anwend-

bare Methode unter Verwendung des Durchflusszytometers zu validieren, über die der intrazelluläre Transport mittels Markerproteine nachverfolgt werden kann. Über magnetische Partikel konnte bereits eine große Menge an Vesikeln aufgereinigt werden. Jedoch zeigten Aufnahmen im TEM, dass die Struktur der Nanopartikel durch die verwendeten magnetischen Säulen beeinträchtigt wird. Eine Alternative sind magnetische Beads, welche über Antikörper spezifisch an die Markerproteine der aufzureinigenden Vesikel binden können. Unter Verwendung von HS (9% und 33%) zum Blocken konnte die Spezifität dieser Bindung erhöht werden. Außerdem konnte nach der Aufreinigung eine Kollokalisierung von Rab5 und EEA1 (ein Rab5 Effektorprotein) detektiert werden, wobei die Kollokalisierung bei der Probe mit 33% HS geringere ausfiel als bei der Vorinkubation der Beads in 9% HS. Durch eine abschließende Validierung dieser Methode, sollte es möglich werden das zelluläre Schicksal der Nanopartikel und damit des Wirkstoffes zu identifizieren, ohne die Notwendigkeit einer Transfektion. Jedoch sind noch weitere Anstrengungen nötig, um das unspezifische Signal zu reduzieren. Eine Variante der Beads die direkt an den Marker spezifischen Antikörper gebunden ist, wäre zum Beispiel eine interessante Möglichkeit um die unspezifischen Bindungen besser kontrollieren zu können. Auch die Verwendung eines speziellen Separationspuffers anstelle des PBS zum Starten, Spülen und Eluieren der Säule könnte zur besseren Durchführbarkeit der Methode beitragen. So wird von Miltenyi Biotec bereits ein Kit zur Isolation von Mitochondrien aus humanem Gewebe angeboten. Der im Kit verwendete Puffer könnte auch in Verbindung mit der hier beschriebenen Aufreinigung von Transportvesikeln getestet werden.

## 6 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Masterarbeit unterstützt und motiviert haben.

Zunächst einmal gilt mein Dank Prof. Dr. Katharina Landfester und PD Dr. Volker Mailänder für die Möglichkeit meine Masterarbeit in ihrer Gruppe anfertigen zu können und besonders PD Dr. Volker Mailänder für Unterstützung und Anleitung während der Bearbeitung.

Außerdem möchte ich PD Dr. Joachim Urban danken, dass er sich bereit erklärt hat die Rolle des Zweitgutachters zu übernehmen.

Ein großes Dankeschön auch an Manuel Tonigold für eine hervorragend Einarbeitung und ein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen.

Weiterhin möchte ich Thomas Wolf, Katja Klein und Diego Estupinan für die Herstellung der Nanopartikel, Patricia Renz für die Messungen am TEM, Jonas Reinholz für die zur Verfügung gestellten Caco-2 Zellen und Johanna Simon für das IgG reduzierte Plasma danken. Ohne eure Unterstützung wären all diese Versuche nicht möglich gewesen.

Ein spezieller Dank an die komplette Bio-Gruppe für eine schöne Zeit am Institut und einer sehr angenehme Arbeitsatmosphäre! Es war immer jemand da sowohl für wissenschaftliche Diskussionen, als auch für Pausen füllende weniger wissenschaftlich geprägte Gespräche. An dieser Stelle auch ein riesiges Dankeschön an Maria und Raweewan für ein absolut problemloses Beisammensein auf engstem Büroraum.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Familie, Freunden und Paul für Ihre Unterstützung und insbesondere dafür, dass sie mir die Vernachlässigung der letzten 9 Monate nicht übel nehmen.

## Literaturverzeichnis

Aivazian, D., et al. (2006). "TIP47 is a key effector for Rab9 localization." The Journal of cell biology **173**(6): 917-926.

Antonelli, A., et al. (2013). "New strategies to prolong the in vivo life span of iron-based contrast agents for MRI."

Bannwarth, M. B., et al. (2013). "Well-Defined Nanofibers with Tunable Morphology from Spherical Colloidal Building Blocks." Angewandte Chemie International Edition **52**(38): 10107-10111.

Bannwarth, M. B., et al. (2015). "Colloidal Polymers with Controlled Sequence and Branching Constructed from Magnetic Field Assembled Nanoparticles." ACS nano **9**(3): 2720-2728.

Bannwarth, M. B., et al. (2014). "Reversible Redox-Responsive Assembly/Disassembly of Nanoparticles Mediated by Metal Complex Formation." Chemistry of Materials **26**(3): 1300-1302.

Bucci, C., et al. (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." Cell **70**(5): 715-728.

Cedervall, T., et al. (2007). "Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(7): 2050-2055.

Chen, J. W., et al. (1985). "Identification of two lysosomal membrane glycoproteins." The Journal of cell biology **101**(1): 85-95.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.

De Carlo, S. and J. R. Harris (2011). "Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM." Micron **42**(2): 117-131.

Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annual review of biochemistry **78**: 857-902.

Ehrenberg, M. S., et al. (2009). "The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells." Biomaterials **30**(4): 603-610.

Engering, A. and J. Pieters (2001). "Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells." International immunology **13**(2): 127-134.

Ferreira, F., et al. (2012). "Endocytosis of G protein-coupled receptors is regulated by clathrin light chain phosphorylation." Current Biology **22**(15): 1361-1370.

Fischer, M. J. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. Surface plasmon resonance, Springer: 55-73.

Ford, M. G., et al. (2002). "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin." Nature **419**(6905): 361-366.

Franko, A., et al. (2013). "Efficient isolation of pure and functional mitochondria from mouse tissues using automated tissue disruption and enrichment with anti-TOM22 magnetic beads."

Gabizon, A., et al. (1994). "Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes." Cancer Research **54**(4): 987-992.

Gabizon, A., et al. (2003). "Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin." Clinical pharmacokinetics **42**(5): 419-436.

Galvez, T., et al. (2012). "SnapShot: mammalian Rab proteins in endocytic trafficking." Cell **151**(1): 234-234. e232.

Gref, R., et al. (2012). "The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres." Advanced drug delivery reviews **64**: 316-326.

Guarnieri, D., et al. (2011). "Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells." Journal of Nanoparticle Research **13**(9): 4295-4309.

Herman, E., et al. (1983). "Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles by liposomal encapsulation." Cancer Research **43**(11): 5427-5432.

Herold, D. A., et al. (1989). "Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase." Biochemical pharmacology **38**(1): 73-76.

Hyttinen, J. M., et al. (2013). "Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1833**(3): 503-510.

Illum, L., et al. (1987). "The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer-poloxamine 908." Life sciences **40**(4): 367-374.

Jokerst, J. V., et al. (2011). "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy." Nanomedicine **6**(4): 715-728.

Landfester, K. (2009). "Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **48**(25): 4488-4507.

Le, P. U., et al. (2002). "Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum." Journal of Biological Chemistry **277**(5): 3371-3379.

- Lesniak, A., et al. (2012). "Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells." ACS nano **6**(7): 5845-5857.
- Lim, J. P. and P. A. Gleeson (2011). "Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps." Immunology and cell biology **89**(8): 836-843.
- Lundqvist, M., et al. (2008). "Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(38): 14265-14270.
- Mailander, V. and K. Landfester (2009). "Interaction of nanoparticles with cells." Biomacromolecules **10**(9): 2379-2400.
- Mantegazza, A. R., et al. (2004). "CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells." Blood **104**(4): 1183-1190.
- Merrifield, C. J., et al. (2002). "Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits." Nature Cell Biology **4**(9): 691-698.
- Mohanraj, V. and Y. Chen (2007). "Nanoparticles-a review." Tropical Journal of Pharmaceutical Research **5**(1): 561-573.
- Mu, F.-T., et al. (1995). "EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved  $\alpha$ -helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif." Journal of Biological Chemistry **270**(22): 13503-13511.
- Natarajan, J. V., et al. (2014). "Sustained-release from nanocarriers: a review." Journal of Controlled Release **193**: 122-138.
- Nielsen, E., et al. (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." Nature Cell Biology **1**(6): 376-382.
- Owens, D. E. and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." International journal of pharmaceutics **307**(1): 93-102.
- Pearson, R. M., et al. (2014). "Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery." Frontiers in chemistry **2**.
- Perry, J. L., et al. (2012). "PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics." Nano letters **12**(10): 5304-5310.
- Pols, M. S. and J. Klumperman (2009). "Trafficking and function of the tetraspanin CD63." Experimental cell research **315**(9): 1584-1592.
- Prasad, G. (2009). Biomedical applications of nanoparticles. Safety of Nanoparticles, Springer: 89-109.



- Ramirez, L. P. and K. Landfester (2003). "Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes." Macromolecular Chemistry and Physics **204**(1): 22-31.
- Rao, J. P. and K. E. Geckeler (2011). "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters." Progress in Polymer Science **36**(7): 887-913.
- Raposo, G. and W. Stoorvogel (2013). "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." The Journal of cell biology **200**(4): 373-383.
- Rink, J., et al. (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-749.
- Ritz, S., et al. (2015). "Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake." Biomacromolecules **16**(4): 1311-1321.
- Rubino, M., et al. (2000). "Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes." Journal of Biological Chemistry **275**(6): 3745-3748.
- Runa, S., et al. (2014). PEGylated nanoparticles: protein corona and secondary structure. SPIE NanoScience+ Engineering, International Society for Optics and Photonics.
- Sahay, G., et al. (2010). "Endocytosis of nanomedicines." Journal of Controlled Release **145**(3): 182-195.
- Saiyed, Z., et al. (2003). "Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine." BioMagnetic Research and Technology **1**(1): 2.
- Schweitzer, J. K., et al. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.
- Simonsen, A., et al. (1998). "EEA1 links PI (3) K function to Rab5 regulation of endosome fusion." Nature **394**(6692): 494-498.
- Sorkin, A. (2004). "Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort." Current opinion in cell biology **16**(4): 392-399.
- Tenzer, S., et al. (2013). "Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology." Nature nanotechnology **8**(10): 772-781.
- Tokarev, A. A., et al. (2009). Overview of intracellular compartments and trafficking pathways. Trafficking Inside Cells, Springer: 3-14.
- Treuel, L., et al. (2013). "New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles." Journal of The Royal Society Interface **10**(82): 20120939.
- Ulbricht, J., et al. (2014). "On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly (2-oxazoline) s." Biomaterials **35**(17): 4848-4861.

- Ullrich, O., et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." The Journal of cell biology **135**(4): 913-924.
- Vitelli, R., et al. (1997). "Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway." Journal of Biological Chemistry **272**(7): 4391-4397.
- Walczyk, D., et al. (2010). "What the cell "sees" in bionanoscience." Journal of the American Chemical Society **132**(16): 5761-5768.
- Walkey, C. D. and W. C. Chan (2012). "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment." Chemical Society Reviews **41**(7): 2780-2799.
- Wang, X., et al. (2014). "The development of site-specific drug delivery nanocarriers based on receptor mediation." Journal of Controlled Release **193**: 139-153.
- Winkelstein, J. A. (1973). "Opsonins: their function, identity, and clinical significance." The Journal of pediatrics **82**(5): 747-753.
- Wolf, T., et al. (2015). "A Library of Well-Defined and Water-Soluble Poly (alkyl phosphonate) s with Adjustable Hydrolysis." Macromolecules **48**(12): 3853-3863.
- Zhao, F., et al. (2011). "Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials." Small **7**(10): 1322-1337.
- Zhou, L.-J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(6): 2588-2592.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Masterarbeit selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

---

Ort, Datum, Unterschrift