Markierung immortalisierter Zelllinien und Stammzellen mit funktionalisierten Partikeln für biomedizinische Anwendungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm



vorgelegt von

Myriam Ricarda Lorenz
aus Kirchheim unter Teck

Ulm im Jahre 2007

Organische Chemie III

Makromolekulare Chemie und Organische Materialien

Institut für klinische
Transfusionsmedizin
und Immunogenetik



Markierung immortalisierter Zelllinien und Stammzellen mit funktionalisierten Partikeln für biomedizinische Anwendungen

UNIVERSITÄT ULM · SCIENDO · DOCENDO · CURANDO

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

Myriam Ricarda Lorenz
aus Kirchheim unter Teck

Ulm im Jahr 2007

Amtierender Dekan	Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
1. Gutachterin	Frau Prof. Dr. Katharina Landfester
2. Gutachter	Herr Prof. Dr. Dirk Volkmer
3. Gutachter	Herr Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier
Tag der Promotion	19.07.2007

Die Welt hat Rätsel, aber sie hat ebensoviele Lösungen, hundertmal schöner als die Rätsel.

Martin Liechti

Für meine Familie

Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin-D
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop (confocal laser scanning microscope)
CPD	Kritischer Punkt Trockner (Critical Point Dryer)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	Tetraazacyclododecane-tetraacetat
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure (diethylenetriaminepentaacetic acid)
EPC	endotheliale Progenitorzelle (endothelial Progenitor cell)
FA	Folsäure (Folic Acid)
FACS	fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FSC	Vorwärtsstreuung (Forward scatter)
Gd	Gadolinium
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (Hematopoietic Stem Cell)
LHRH	luteinising hormone releasing hormone
LMA	Lauryl Methacrylat
MePEG	Methoxy-Polyethylenglykol
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell)
nFL1	normalisierte Fluoreszenzintensität (Kanal 1)
NK	Negativkontrolle (negative control)
PBCA	Polybutylcyanacrylat (poly(n-butylcyanoacrylate))
PEC	Polythylencarbonat
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Poly(ethylenimin)
PEO	Polyethylenoxid
Phe	Phenylalanin
PLA	Poly lactid acid
PLGA	Poly (Lactid-Co-Glycolid)
PLL	Poly-L-Lysin

PMI	Perylenmonoimid
REM	Rasterelektronenmikroskop (SEM: Scanning Electron Microscope)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPIO	superparamagnetisches Eisenoxid (superparamagnetic iron oxide)
SSC	Seitwärtsstreuung (Sideward scatter)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (Transmission Electron Microscope)
USPIO	ultrakleines superparamagnetisches Eisenoxid (ultrasmall superparamagnetic iron oxide)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Theorie 4
2.1 Partikel für biomedizinische Anwendungen 4
2.2 Funktionalisierung der Nanopartikel 7
2.3 Eigenschaften einzelner Nanopartikel und Zellaufnahme 13
2.4 Magnetische Nanopartikel 14
2.5 Zellsysteme für biomedizinische Anwendungen 16
2.6 Zelluläre Aufnahmemechanismen 18
3 Methoden 21
3.1 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 21
3.2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM confocal laser scanning microscope) 23
3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) 24
3.4 Rasterelektronenmikroskopie (englisch SEM: Scanning Electron Microscope) 26
3.5 Berliner-Blaufärbung 27
3.6 Ferrozin-Test 27
3.7 Magnetresonanztomographie (MRT) 27
4 Material und Durchführung 29
4.1 Zellkultur 34
4.2 Fluorescence Activated Cell Sorter 34
4.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM) 35
4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) 35
4.5 Rasterelektronenmikroskopie (SEM) 35
4.6 Toxizitätstests 36
4.7 Hochgeschwindigkeitszellsorter 36
4.8 Berliner-Blaufärbung 36
4.9 Quantitative Eisen-Messung mit einem Ferrozin-Test 36
4.10 Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) 38
5 Ergebnisse und Diskussion 39
5.1 Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel 39
5.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen bei MSCs 39
5.1.2 Lokalisation durch das TEM 43
5.1.3 Quantitative Eisenmessung 45
5.1.4 Toxizität hoher Konzentrationen an SPIOs 50
5.1.5 MRT 52

5.2 Partikel mit COOH-Gruppen auf der Oberfläche 53
5.2.1 FACS 54
5.2.2 CLSM 56
5.2.3 TEM 58
5.3 Partikel mit Aminogruppen auf der Oberfläche 61
5.3.1 Aminogruppenfunktionalisierte Partikel mit uneinheitlichem Durchmesser 61
5.3.1.1 HeLa-Zellen und MSCs 62
5.3.1.1.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen im FACS 62
5.3.1.1.2 Lokalisation der Partikel mittels CLSM 64
5.3.1.1.3 Lokalisation der Partikel mittels TEM und SEM 65
5.3.1.1.4 Partikelkoagulation 69
5.3.1.1.5 Kinetik der Partikelaufnahme 70
5.3.1.2 KG1a- und Jurkat-Zellen 72
5.3.1.2.1 FACS-Analyse 72
5.3.1.2.2 CLSM-Analyse 73
5.3.1.2.3 TEM-Analyse 75
5.3.2 Aminogruppenfunktionalisierte Partikel mit einheitlichem Durchmesser 76
5.3.2.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS 77
5.3.2.2 Lokalisation mittels CLSM 78
5.3.2.3 Lokalisation mittels TEM 83
5.4 Aminosäurefunktionalisierte Partikel 85
5.4.1 Aminosäurefunktionalisierte Fluoreszenzpartikel 85
5.4.1.1 Fluoreszenzmessungen am FACS 86
5.4.1.2 Lokalisation mittels CLSM 87
5.4.2 Aminosäurefunktionalisierte Magnetitpartikel 92
5.4.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen funktionalisierter Eisenoxidnanopartikel 92
5.4.2.2 Lokalisation mittels TEM 93
5.4.2.3 Quantitative Eisenmessung 95
5.5 Fluoreszierende superparamagnetische Partikel 97
5.5.1 Fluoreszenzmessungen am FACS 98
5.5.2 Lokalisation mittels CLSM 99
5.5.3 Quantitative Eisenmessung 100
5.6 Gadoliniumpartikel 102
5.6.1 Fluoreszenzmessungen am FACS 103
5.6.2 Lokalisation mittels CLSM 104
5.6.3 Lokalisation mittels TEM 105
5.7 Polyisoprenpartikel 108

5.7.1 Kinetik der Partikelaufnahme 109
5.7.2 Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Konzentration 110
5.7.3 Aufnahme oberflächenmodifizierter Polyisoprenpartikel 112
5.7.4 Lokalisation mittels CLSM 113
5.7.5 Lokalisation mittels TEM 116
5.7.6 Lokalisation mittels SEM 117
5.7.7 Fluoreszenzmessungen am FACS 119
5.7.8 Lokalisation mittels CLSM 121
5.8 Poly(n-butylcyanacrylat)-Partikel 123
5.8.1 Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Konzentration 124
5.8.2 Vitalitätsexperimente 125
5.8.2.1 FACS-Messungen 126
5.8.2.2 CLSM-Analyse 128
5.8.3 Aufnahmekinetik 129
5.8.4 Lokalisation der Partikel mittels CLSM 137
5.9 Poly-L-Lactid-Partikel 140
5.9.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS 141
5.9.2 Lokalisation der Partikel mittels CLSM 142
5.9.3 Lokalisation mittels TEM 144
6 Zusammenfassung und Ausblick 145
7 Outlook and summary 147
8 Literatur 149
Danksagung 162
Lebenslauf 163
Publikationen 164
Veröffentlichungen 165
Erklärung 166

1 Einleitung

Die Nanotechnologie stellt ein Forschungsgebiet vieler spezialisierter Fachgebiete der Naturwissenschaften dar und beschäftigt sich mit der Forschung und Konstruktion sehr kleiner Strukturen von einem bis einhundert Nanometern. Sie gilt als Zukunftstechnologie und spielt in der Medizin, der Biotechnologie, der Mikroelektronik und der Werkstofftechnik eine wichtige Rolle. Es sollen Strukturen, Geräte und Systeme geschaffen und genutzt werden, die aufgrund ihrer geringen Größe neue Eigenschaften und Funktionen aufweisen. Dazu gehören unter anderem immer kleinere Datenspeicher mit sehr hoher Speicherkapazität sowie nanochirurgische Werkzeuge. Nano stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Zwerg“ (griech. Nánnos=Zwerg). Richard Feynman gilt auf Grund seines im Jahr 1959 gehaltenen Vortrages „There`s Plenty of Room at the Bottom“ als der Vordenker der Nanotechnologie [1], obgleich der Begriff Nanotechnologie von Norio Taniguchi 1974 geprägt wurde [2]. Bekanntheit erlangte das Forschungsgebiet allerdings erst 1986 durch das von Eric Drexler veröffentlichte Buch „Engines of Creation“ [3]. Auch die Kolloidchemie stellt einen großen Forschungsbereich der Nanotechnologie dar. Auf diesem Gebiet wurde in der Antike bereits „Nanotechnologie“ betrieben. So waren im Altertum Pigmente und Ton mit Nanopartikeln bekannt.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Durchführbarkeit und Effizienz der Zellmarkierung mit Partikeln. Ferner sollte der Einfluss der Oberflächenladung der Partikel auf die Aufnahme in Zellen mit in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Es sollten Partikel mit funktionalisierten Oberflächen synthetisiert werden, die optimale Aufnahmeraten in die Zellen zeigen. Hierzu wurden Partikel mittels des Miniemulsionsprozesses am Institut für Organische Chemie III synthetisiert. Diese Art der Heterophasenpolymerisation ermöglicht es, die Oberflächenladungen der Partikel zu modifizieren. Unterschiedliche Oberflächenladungen der Partikel wurden durch die Variation des Anteils an copolymerisiertem Monomer erreicht. Um die Partikel detektieren zu können, wurde ein fluoreszierender Farbstoff (Perylenmonoimid) in die Partikel eingebaut. Es sollten die Unterschiede der Partikelaufnahme in verschiedene Zelllinien, die klinische Relevanz besitzen, charakterisiert werden. Als Modell für $CD34^+$-hämatopoetische Stammzellen dienten KG1a-Zellen, Jurkat-Zellen wurden als Modell für T-Zellen ausgewählt. Des Weiteren fanden die gut etablierte HeLa-Zelllinie, sowie mesenchymale Stammzellen (MSC), die ein hohes Regenerationspotential zeigen, Anwendung.

Zunächst wurden die käuflich verfügbaren und für klinische Anwendungen zugelassenen superparamagnetischen Kontrastmittel Resovist® und Feridex©

/Endorem© hinsichtlich der Durchführbarkeit und Effizienz der Markierung von Stammzellen und verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei sollte der Unterschied zwischen den beiden Kontrastmitteln Resovist® und Feridex© ermittelt werden. Resovist® besitzt eine Hülle aus Carboxydextran, während Feridex© nur eine Dextranhülle aufweist. Da Resovist® und Feridex© aufgrund der Dextranhülle eine hohe Instabilität besitzen, wurden superparamagnetische Nanopartikel mit stabiler Polymerhülle am Institut für organische Chemie III mittels Miniemulsionsprozess synthetisiert.

Eine derartige Syntheseroute ermöglicht eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche sowie eine unabhängige Variation der Partikelgröße. Die Partikelhülle ist weiteren Modifikationen, z.B. dem Anknüpfen von biofunktionellen Gruppen, zugänglich. Als Polymerhülle wurde Polystyrol eingesetzt. Dieses eignet sich hervorragend als Hüllmaterial, da es nicht bioabbaubar ist, wodurch das Magnetit im Polymerkern nicht degradiert werden kann, wie dies z.B. bei käuflichen Kontrastmitteln wie Feridex oder Resovist, die eine Dextranhülle besitzen, der Fall ist. Damit können Langzeitanwendungen wesentlich vereinfacht werden. Die Eigenschaften einer sehr dichten und homogenen Polymerhülle werden so erfüllt. In dieser Arbeit wurde die Durchführbarkeit und Effizienz der Markierung von verschiedenen Zelllinien und Stammzellen *in vitro* mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln mittels Berliner Blaufärbung, Ferrozin-Test, Transmissionselektronenmikroskopie/Rasterelektronenmikroskopie (TEM/REM) - Analyse und Magnetische Resonanztomographie (MRT) evaluiert.

Neben Eisen, Kobalt und Nickel weist Gadolinium als einziges Element einen Ferromagnetismus auf. Gadolinium zeigt ein breites Anwendungsgebiet. So ist es in Legierungen in Röhrenbildschirmen und Chrom- und Eisenlegierungen enthalten, wird aber auch in der Mikrowellentechnik eingesetzt. In der Medizin findet es aufgrund seines hohen magnetischen Moments als Kontrastmittel in der Kernspintomographie Anwendung [4]. In Zellmarkierungsversuchen wurden Gadoliniumnanopartikel in dieser Arbeit getestet.

Polyisopren ist ein gut bekanntes Biopolymer, das meistens aus *Hevea brasiliensis* oder auch synthetisch gewonnen wird und als Latex bezeichnet wird. Es erweist sich aufgrund der Ähnlichkeit zu Terpenstrukturen als biologisch schwer abbaubar. In den vorliegenden Arbeiten sollten die Eigenschaften von fluoreszierenden Polyisoprennanopartikeln hinsichtlich Zellmarkierung *in vitro* untersucht werden. Die Polyisoprennanopartikel könnten aufgrund ihrer Stabilität für *in vitro*- oder *in vivo*-Zellmarkierungen in Langzeitanwendungen geeignet sein. Es sollte der Vermutung, dass das Polymer an sich einen großen Einfluss auf die Aufnahme in Zellen, insbesondere bei Polymeren mit großer Ähnlichkeit hinsichtlich in der Natur

vorkommenden Strukturen besitzt, nachgegangen werden. Polyisopren wurde hierfür ausgewählt, da dessen Terpen-Struktur in vielen Verbindungen in der Natur vorkommt (ätherische Öle, viele Pflanzenteile).

Da Polystyrol und Polyisopren bisher nicht für biomedizinische Anwendungen zugelassen sind, wurden des Weiteren (Poly(n-butylcyanacrylat)) (PBCA) Nanopartikel synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien und Stammzellen mit unterschiedlich synthetisierten PBCA-Nanopartikeln inkubiert und neben der Aufnahmekinetik auch die Toxizität der Partikel bestimmt.

2 Theorie

2.1 Partikel für biomedizinische Anwendungen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Anwendung von Nanopartikeln. Auf sie wird in diesem Kapitel genauer eingegangen. Markierung von Zellen mit Partikeln im Nanometer-Bereich zur *in vivo*-Detektion ist aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften für die unterschiedlichsten biomedizinischen Anwendungen von zunehmender Bedeutung. Nanopartikel besitzen gute Stabilitätseigenschaften und zeichnen sich dadurch aus, dass die Oberflächeneigenschaften gegenüber den Volumeneigenschaften überwiegen. Daher sind sie zur Detoxifizierung [5] geeignet. Dabei sollen zum Beispiel Vergiftungen durch Medikamente oder radioaktive Verbindungen bekämpft werden.

Eine gezielte Bereitstellung von Medikamenten in Zielgewebe von Patienten durch Nanopartikel ist eine der vielversprechendsten Techniken, um die Wirksamkeit von Medikamenten zu erhöhen [6-13]. Bei dem Drug-Targeting (gewebsspezifische Wirkstoffvermittlung) sollen Wirkstoffe selektiv in bestimmten Geweben angereichert werden. Durch die hohe Selektivität und Spezifität der Wirkstoffe kann eine möglichst geringe Toxizität der Substanz und gleichzeitig eine hohe Wirksamkeit erreicht werden [14]. Durch die Verkapselung oder Adsorption von Medikamenten in/an die Oberfläche von Transportsystemen kann das Medikament wirksam gegen Abbau oder Metabolisierung nach der humanen Applikation geschützt werden [15, 16]. Selbst neue Wege der Medikamentengabe wie zum Beispiel orale Applikationen von Insulin oder Heparin könnten ermöglicht werden [15, 16].

Der Wirkstoff kann entweder im Partikelinneren verkapselt oder durch Adsorption mittels kovalenter oder durch ionische Wechselwirkungen an die Partikelmatrix gebunden werden. Bei verkapselten Wirkstoffen ist es erforderlich, dass das Medikament aus dem Partikelinneren freigesetzt werden kann. Für eine langsame Freisetzung des Medikamentes sind abbaubare Polymere wie Poly(alkylcyanacrylate) (PACA), Polyester (zum Beispiel Poly(ε-caprolacton) oder Poly(D,L-lactid) die erste Wahl [16-23]. Weitere Beispiele für bioabbaubare Polymere sind das pH-sensitive PEGMa (Poly(ethylenglycol)Methacrylat) [24] und das pH-sensitive PEO (Polyethylenoxid)-Nanopartikeln [25]. Dabei erfolgt das Drug-Release (Wirkstofffreisetzung) in dem sauren Milieu von Endosomen/Lysosomen und in der sauren Umgebung von Tumorgewebe [25]. Eine länger anhaltende gut dosierte Wirkstofffreisetzung ist für viele biomedizinische Anwendungen von Bedeutung. Damit die Partikel möglichst lang im Blutstrom zirkulieren, dürfen die Partikel nicht mit Proteinen im Serum aggregieren oder einen Durchmesser von weniger als 5 µm

besitzen, da sie sonst innerhalb weniger Minuten vom retikuloendothelialen System aus dem Blutstrom entfernt werden. Kleine Partikel mit wenigen Nanometern Durchmesser werden als Giftstoffe in der Leber abgebaut. Um eine unspezifische Bindung der Partikel an eine andere Gewebeart als das Zielgewebe sowie eine Opsonisierung der Partikel durch Serumproteine und anschließende Phagozytose durch Makrophagen zu verhindern, erfolgt ein Targeting spezifischer Zelltypen. Die am weitesten verbreitete Methode, eine Opsonisierung der Partikel zu verhindern ist, die Partikel mit einer hydrophilen Schale aus Polyethylenglykol (PEG) oder Kohlenhydraten zu umgeben [26-31]. Diese Schale minimiert die unspezifische Adsorption von Proteinen an der Partikeloberfläche, wobei die Partikel von Makrophagen nicht erkannt werden können. Dadurch werden die Partikel im Blutkreislauf nicht angegriffen und die Wahrscheinlichkeit, dass sie in das Zielgewebe (zum Beispiel Tumor) gelangen, ist höher (Passives Targeting) [32-34].
Liposomen sind kugelförmige Aggregate oberflächenaktiver Moleküle mit hydrophoben und hydrophilen Enden in einer Flüssigkeit, die sich zu Doppelschichten zusammenlagern und eignen sich aufgrund der starren undurchlässigen Doppelschicht zum Transport von Wirkstoffen in Zielgewebe, zum Beispiel Tumoren. An die Oberfläche der Liposomen wird als Schutz meist Polyethylenglykol gebunden.
Eine weitere Verbesserung des Targetings kann durch die Anbindung von Liganden, die nur von einem spezifischen Rezeptor erkannt werden, an die Partikeloberfläche erfolgen. Als Liganden eignen sich kleine Moleküle wie Folsäure [35-37].
Biokompatible Partikel mit und ohne Polymerhülle werden aber auch als nicht-virale Vehikel in der Gentherapie eingesetzt [38-43]. Dabei sollen biologische Substanzen wie therapeutische Gene, monoklonale Antikörper, RNA und Impfstoffe in Zellen gebracht werden. So eignen sich zum Beispiel chemisch modifizierte Silikatnanopartikel, die kleiner als 200 nm im Durchmesser sind und den Stoffwechsel der Zellen nicht beeinflussen, als Transport-Vehikel für DNA-Sequenzen [44, 45].
Hinsichtlich der Einschleusung von Impfstoffen [46-52] zur Immunisierung müssen die Partikel bioabbaubar sein. Hierfür scheinen Polymere wie Poly(methylmethacrylat) (PMMA) besonders geeignet [53].
Als Trägersysteme für Arzneimittel stehen nicht nur Nanopartikel zur Verfügung, sondern auch Mikropartikel. Diese stellen zum einen Mikrokapseln, bei denen der Wirkstoff von Polymer umhüllt wird und die einen Durchmesser von mehr als 250 mm aufweisen, dar und zum anderen Mikrosphärulen, bei denen der Wirkstoff entweder gelöst oder dispergiert in der Polymermatrix vorliegt. Die Polymermatrix sollte eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Freisetzung von Wirkstoffen erfolgt zum Beispiel

aus pH sensitiven Mikropartikeln [54, 55]. Passive Hydrolyse oder passiver Abbau der Polymermatrix zu physiologischen Metaboliten erfolgt bei Einsatz von PLA (Polylactid; Polymilchsäure)/PLGA (Polyglycolid). Dabei ist die Abbaugeschwindigkeit von Polylactid zu Milchsäure (Monate), die stärker hydrophob ist, verglichen mit der Glykolsäure geringer. Bei Mikrokapseln erfolgt die Wirkstofffreisetzung durch Porendiffusion, Matrixerosion oder Tiefenerosion [56]. Kommerziell erhältlich sind mehrere Mikropartikel mit Wirkstoffen, die eine Agonistfunktion für Hormonrezeptoren besitzen.

Die Bereitstellung von Medikamenten ins Gehirn zur Bekämpfung vieler neurologischer Erkrankungen stellt aufgrund der Blut-Hirnschranke eine Herausforderung dar [57-59]. Lipide können die Blut-Hirnschranke durchdringen, während für Substanzen wie Aminosäuren, Vitamin C in der oxidierten Form [60] und Glucose aktive Transportmechanismen bestehen. Aufgrund der Eigenschaft der Lipide, die Blut-Hirnschranke zu durchdringen, wird häufig ein lipid-vermittelter Wirkstofftransport mittels lipophiler Moleküle [61] durchgeführt. So erreichen lipophile Pharmaka mit einem niedrigen Molekulargewicht von 500 Da [62] das Gehirn. Des Weiteren können auch Biomoleküle wie Membrantransporterproteine [63] oder Aminosäuren [64], die chemotherapeutische Effekte besitzen, ins Gehirn aufgenommen werden. Nach ersten erfolgreichen *in vitro*-Versuchen mit Polysorbat80-beschichteten PMMA-Partikeln [65] konnten Medikamente mittels Polysorbat80 modifizierten Poly(n-butylcyanacrylat)-Nanopartikeln ins Mausgehirn transportiert und dort freigesetzt werden [66-71]. Zur Bereitstellung von Medikamenten im Gehirn sind verschiedene funktionalisierte bioabbaubare Polymernanopartikel geeignet, die die Blut-Hirnschranke durchdringen [72]. Eine Markierung neuronaler Systeme mittels Nanopartikeln und eine Wirkstofffreisetzung aus diesen ist mit organisch modifizierten Silikonnanopartikeln [73], Polyalkylcyanacrylat-Nanopartikeln [74] und mittels superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel [75-78] gelungen. Polyvinylalkohol-funktionalisierte Eisenoxidnanopartikel könnten mittels MRT zur Detektion geschädigter Hirnareale dienen [79]. Nanopartikel, die mit Chelatoren konjugiert werden, können Beta-Amyloid-Aggregationen und Metallanreicherungen, die im Gehirn bei neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson anfallen, reduzieren [80, 81]. Beta-Amyloid-Aggregationen können auch mittels magnetischem Resonanz-Mikro-Imaging nach Markierung mit funktionalisierten Eisenoxidnanopartikeln detektiert werden [82]. PEGylierte Polycyanacrylat-Nanopartikel scheinen aufgrund ihrer langen Zirkulationsdauer im Blutstrom und der hohen Anreicherung im Gehirn gut zur Bekämpfung neurodegenerativer Krankheiten geeignet zu sein [83]. Es wurde vermutet, dass eine endozytotische Aufnahme durch die Endothelzellen der

Hirnkapillaren stattfindet [66]. Da das Apolipoprotein APO-E sowohl im Gehirn als auch an der Blut-Hirnschranke Rezeptoren besitzt [84-86] und zur Aufnahme in Hirnendothelzellen an den LDL-Rezeptor bindet [87, 88], wurde die Oberfläche von Polysorbat-beschichteten PBCA-Partikeln mit dem Apolipoprotein beschichtet [89]. 1998 konnten Kreuter und Alyautdin zeigen, dass mit APO-E adsorbierte wirkstoffbeladene PBCA-Nanopartikel besser durch die Blut-Hirnschranke transportiert werden [90]. Auch partikuläre Systeme wie Liposomen [91-93] werden zur Behandlung neuronaler Krankheiten eingesetzt. Neuronale Systeme können des Weiteren mittels verzweigter Polymere mit superparamagnetischen Eisenoxid-Bestandteilen, sogenannten Magnetodendrimeren [94], markiert werden. Zur Behandlung neuronaler Erkrankungen mittels Drug-Targeting werden auch noch andere Mechanismen untersucht. Gezieltes Drug targeting kann auch durch neuronale Rezeptoren wie zum Beispiel den neuronalen Nikotinacetylcholinrezeptor [95] oder Ca^{2+}-aktivierte K^{+}-Kanäle [96] vermittelt werden. Neben viralen Vektoren [97] wie dem Alphavirus [98] können nicht virale Peptid-Vektoren [62, 99, 100] zur neuronalen Markierung eingesetzt werden. Markierte neuronale Progenitorzellen [101] finden zur Detektion von Hirntumoren Verwendung. Es werden Implantationen von Stammzellen [102] oder anderen Zellen, die mit neurotropischer Faktor-DNA transfiziert wurden [103], in geschädigte Hirnareale vorgenommen.
Nanopartikel werden des Weiteren als polymere Tenside in der Kosmetik [104], Körperpflege, als Reinigungs- und Lebensmittel eingesetzt (zum Beispiel Methylcellulose) [105].

2.2 Funktionalisierung der Nanopartikel

Für die Verwendung von Nanopartikeln in biomedizinischen Anwendungen müssen diese je nach Einsatzgebiet besondere Eigenschaften aufweisen. Die Eigenschaften des als Kapselmaterial verwendeten Polymers sind für unterschiedliche Anwendungsbereiche, zum Beispiel für die Art der Oberflächenfunktionalisierung, den Einsatz von verkapselten Medikamenten sowie die Markierung mit Eisenoxid ausschlaggebend. So ist es zum Beispiel für Zellmarkierungen und anschließender *in vivo*-Detektion mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) bedeutsam, dass die superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel stabil sind und eine möglichst homogene Magnetisierung besitzen. Im Gegensatz dazu ist beim Drug-Targeting, bei dem der Wirkstoff verkapselt vorliegt (Abbildung 1), im Zielgewebe ein Abbau der Nanopartikel, der das Drug-Release ermöglicht, notwendig. Die Wahl des Kapselmaterials spielt dabei eine entscheidende Rolle. Das Kapsel-/Partikelmaterial bestimmt auch, welche Oberflächenmodifikationen der Nanopartikel durchgeführt

werden können.

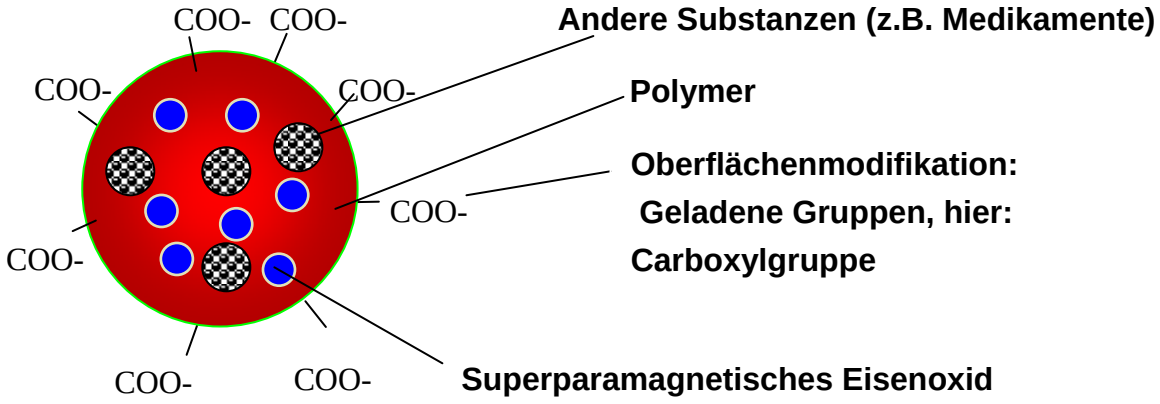


Abbildung 1: Skizze eines biofunktionalisierten Polymernanopartikels, der an der Oberfläche COOH-Gruppen trägt. Im Kapselmaterial befindet sich ein verkapselt vorliegender Wirkstoff sowie superparamagnetische Eisenoxidpartikel.

Nanopartikel können aus natürlich vorkommenden Makromolekülen wie Fibrin, Stärke, Chitin, Gelatine, Kollagen und Albumin hergestellt werden. Die Synthese kann zum Beispiel durch chemische Quervernetzung erfolgen. Hierbei werden zum Beispiel Stärkepartikel mit Formaldehyd, Glutaraldehyd [106] oder Calciumchlorid [107] quervernetzt. Dies kann hinsichtlich Biokompatibilität und Immunogenität negative Auswirkungen zeigen. Albuminnanopartikel werden mit Hilfe der Denaturierung der Proteine hergestellt, indem sie auf 100-140°C erhitzt werden [108]. Gelatine-, Albuminnanopartikel und Partikel aus Cellulosederivaten können mit Hilfe der Desolvatisierung hergestellt werden [109-111]. Dabei kommt es durch pH-Wertänderungen zu Ladungsänderungen. Dies führt zum Aussalzungseffekt, wobei die Biomoleküle entweder ausfallen oder Koazervate bilden.
Bei der Herstellung von Nanopartikeln spielen nass-chemische Verfahren wie die chemische Herstellung in Lösungen (z.B. Sol-Gel-Methode oder Mikroemulsionspolymerisation) zur Erzeugung optischer Werkstoffe oder Beschichtungen auf Kunststoffen eine große Rolle [112, 113]. Bei der Emulsionspolymerisation kommt es zur Ausbildung von Mizellen durch den Emulgaor (z.B. quartäre Ammoniumverbindungen oder Kaliumlaurat), wobei die Mizellen Monomer einschließen [114]. Überschüssiges Monomer befindet sich in kleinen Tropfen in der Emulsion. Durch Zugabe eines wässrigen Initiators zur Emulsion wird die Polymerisation eingeleitet. Dabei dringt der Initiator in die Mizellen und Monomertröpfchen ein. Mit Hilfe dieser Methode werden neben Polyvinylchlorid und

Polyvinylacetat auch Polyacrylate wie zum Beispiel Polyalkylcyanacrylatpartikel hergestellt [115]. Die Polymerpartikel werden als Latexpartikel bezeichnet und durch den Emulgator stabilisiert.

Zur Partikelsynthese und Funktionalisierung von Poly(n-butylcyanacrylat)-Nanopartikeln wurde in der vorliegenden Arbeit der Miniemulsionsprozess, der an die anionische Polymerisation angepasst wurde, angewendet. Mit Hilfe der anionischen Polymerisation kann Polyisobutylcyanacrylat mit schwachen Basen, die freie Elektronenpaare besitzen, katalysiert werden. Dabei korreliert die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Partikelgröße [116].

Unter den Polymernanopartikeln zeichnen sich Polystyrollatices durch bestimmte Eigenschaften wie Monodispersität aus. Außerdem kann die Partikelgröße sehr leicht variiert werden. Des Weiteren sind sie nicht abbaubar und können daher *in vitro* und *in vivo* für Langzeituntersuchungen eingesetzt werden. Da Polystyrol in einem biologischen System jedoch nur sehr schwer identifiziert werden kann, muss es markiert werden. Der einfachste Weg der Markierung von Polystyrol ist fluoreszierende Farbstoffe in die Partikel mit einzubauen. Fluoreszenzdetektion spielt hinsichtlich biologischer Anwendungen wie genetische Detektion und Zellmarkierung bereits eine bedeutende Rolle [117-119]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, ein Polymerpartikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu versehen. Zum einen kann dies mittels physikalischer Adsorption [120] und zum anderen mittels Copolymerisation von einem fluoreszierenden Monomer [121] geschehen. Physikalische Adsorption schafft Probleme wie Instabilität bei veränderten Umweltbedingungen und ist durch den Desorptionsprozess des desadsorbierten Materials eingeschränkt. Der Einbau von fluoreszierendem hydrophoben Comonomer durch Copolymerisation kann mittels des Emulsionsprozesses nicht durchgeführt werden, da der Farbstoff aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit nicht durch die Wasserphase diffundiert, wie dies für eine homogene Inkorporation in den Partikeln erforderlich wäre. Um den hydrophoben Farbstoff in Polymerpartikel einzubringen, ist die Miniemulsionspolymerisation die Methode der Wahl. Hierdurch werden monodisperse kinetisch stabile Tropfen erhalten, wobei eine kleine Menge an Tensid ausreicht. In dem nachfolgenden Polymerisationsprozess werden die Monomertropfen zu Polymerpartikeln umgeformt, ohne die Identität der Tropfen zu verändern.

Unter Miniemulsionspolymerisation versteht man Systeme, die nur wenig Tensid enthalten und durch ein in der dispergierten Phase gut und in der kontinuierlichen Phase schlecht lösliches Reagenz (Hydrophob) stabilisiert werden. Einheitliche Tröpfchengröße sowie eine höhere Stabilität werden durch Ultraschallbehandlung der dispergierten Tröpfchen erhalten. Die Miniemulsionspolymeration ermöglicht

neben dem Einsatz komplexer Monomergemische auch Polyadditionsreaktionen und erlaubt so eine beliebige Variation der Oberflächenstruktur durch die Ankopplung funktioneller Gruppen (Abbildung 2). Dadurch wird die kovalente Anbindung von Biomolekülen, die eine höhere Effizienz und Stabilität als die physikalische Adsorption auszeichnet, ermöglicht [122-124]. Antikörper werden an die Partikeloberfläche angekoppelt, um spezifische Bindungen mit Antigenen zu ermöglichen (z.B. CD20). Hierbei können universelle Linker wie das Streptavidin-Biotin-System (Abbildung 2) verwendet werden, das in der Biologie eine weite Verbreitung aufweist. Polymerpartikel, auf deren Oberfläche Streptavidinmoleküle gebunden haben, werden zugegeben und binden aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu Biotin an die Biotinmoleküle auf der Zelloberfläche.

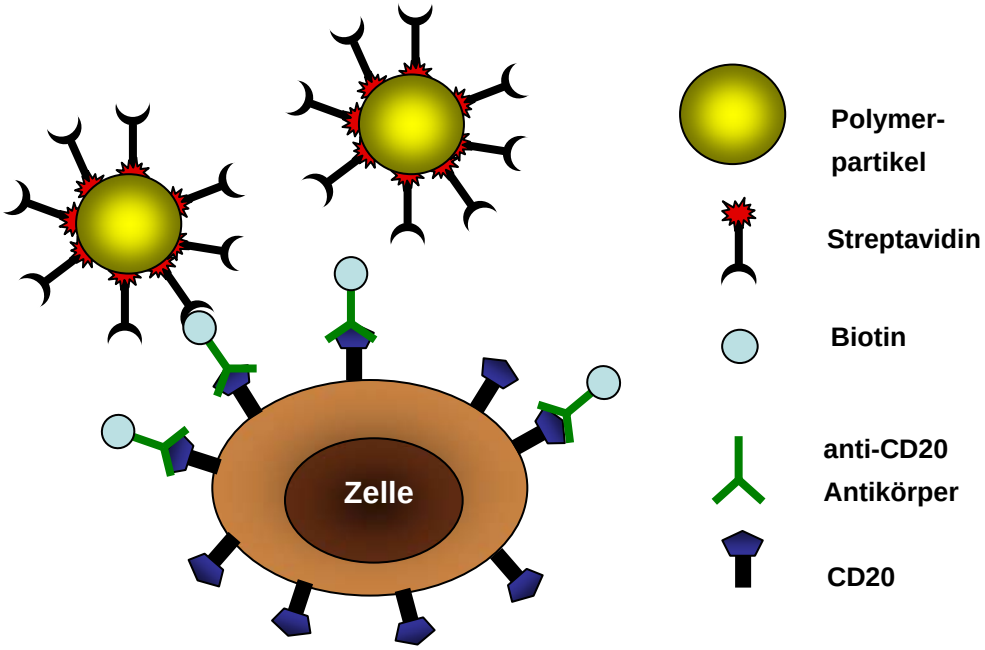


Abbildung 2: Schema des Streptavidin-Biotin-Systems. An der Zellmembran von Daudi-Zellen sollen z.B. CD20-Antikörper an den dort exprimierten CD20-Rezeptor binden. Diese CD20-Antikörper sind wiederum an Biotin geknüpft.

Nach Einstellen der Miniemulsion, das heißt nach Herstellung einer stabilen Dispersion im hydrophoben Monomer (zum Beispiel Styrol), wird dann in einer darauf folgenden Polymerisation der endgültige Polymerlatex gebildet. Ein Radikalstarter leitet die Polymerisation ein. Die Menge an eingesetztem Emulgator entscheidet dabei über die Größe der synthetisierten Polymerpartikel (siehe Abbildung 3).

Es können zum Beispiel Eisenoxidpartikel oder Medikamente direkt eingekapselt werden, indem sie zunächst nach einer entsprechenden Oberflächenbehandlung in

der Monomerphase stabilisiert wurden und dann durch Miniemulsionspolymerisation in das gewünschte Polymer eingebettet werden.
Mittels Miniemulsionspolymerisation wurden fluoreszierende Partikel und Partikel ohne Eisenoxidteilchen mit einem Durchmesser, der von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern reicht, synthetisiert.
Um die Partikel detektieren zu können, wurde ein fluoreszierender Farbstoff in die Partikel eingebaut. Durch Kopolymerisation und Variation des Anteils an kopolymerisiertem Monomer (z.B. Acrylsäure) wurden Nanopartikel erhalten, die eine unterschiedliche Anzahl an COOH-Gruppen auf der Oberfläche besitzen.

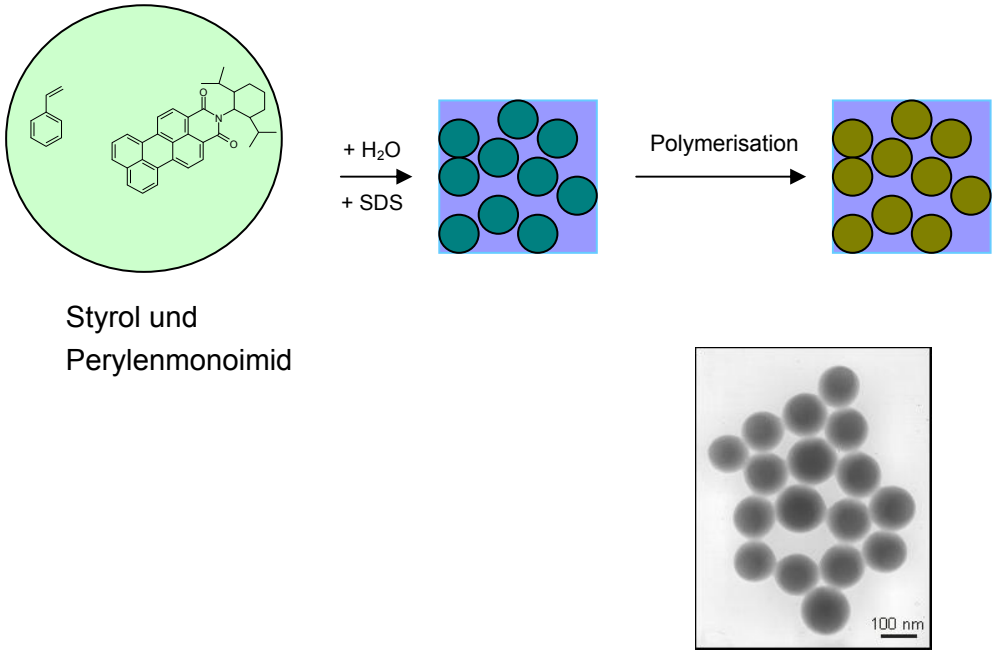


Abbildung 3: Herstellung von fluoreszierenden Polystyrolpartikeln; Ein Fluoreszenzfarbstoff (Perylenmonoimid) wird in das Monomer eingebettet. Nach Zugabe von Wasser und dem Emulgator SDS wird mittels Ultraschallbehandlung eine stabile wässrige Miniemulsion gebildet.

In auf diese Weise erhaltenen Dispersionen superparamagnetischer Nanopartikel zeigten die Polymerpartikel jedoch in ihrem Inneren nur einen superparamagnetischen Anteil von 15%. Außerdem stellte sich aufgrund der magnetischen Anziehung zwischen den Magnetitteilchen keine homogene Verteilung dieser in den Polymerpartikeln ein. Der Arbeitsgruppe Landfester gelang es, das Verfahren so zu modifizieren, dass eine wesentlich homogenere Verteilung der Magnetitteilchen erreicht wurde und Partikel mit einem signifikant höheren superparamagnetischem Anteil synthetisiert werden konnten [125] (siehe Abbildung 4).
Dabei werden zunächst hydrophobierte Magnetitteilchen mit ungefähr 10 nm

Durchmesser über den klassischen Weg der Kopräzipitation hergestellt, um anschließend mittels Miniemulsionsprozess Aggregate in Wasser, die einen Durchmesser von 40-200 nm besitzen, zu erhalten. Dadurch ist es möglich, nicht nur Einzelpartikel, sondern mehrere Magnetitteilchen zu verkapseln. Die Partikel werden durch die Verkapselung mehrerer Magnetitpartikel größer, was den Vorteil hat, dass diese in biologischen Systemen nicht so schnell abgebaut werden (z.B. über die Leber).

Um die Partikel zu hydrophobieren, wird zunächst Ölsäure zugegeben. Eine anschließende Dispersion der hydrobierten Partikel in Oktan ist notwendig, um einen möglichst hohen homogenen Anteil an Magnetitpartikeln in den Aggregaten zu erhalten. Es wird eine stabile wässrige Miniemulsion der Dispersion, ein sogenanntes Ferrofluid, mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ultraschallbehandlung hergestellt. Dabei kann mit der SDS-Konzentration die Größe der Aggregate beeinflusst werden. Durch anschließendes Erhitzen verdampft das Oktan und es bleiben die Magnetitaggregate zurück. Im letzten Schritt wird zu dem Ferrofluid eine Styrolminiemulsion zugegeben und es entstehen Hybridpartikel aus Monomer und Magnetit (Co-Miniemulgierung). Mittels Ultraschall werden Spaltungs- und Fusionierungsprozesse hervorgerufen, wodurch die Aggregate zerstört werden und ausschließlich Hybridpartikel aus Magnetit und Monomer entstehen. Durch einen Initiator wird dann ein Polymerisationsprozess gestartet, der zu Polymer-verkapselten Magnetitpartikeln führt.

Eine derartige Syntheseroute ermöglicht eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche, sowie eine unabhängige Variation der Partikelgröße und der Art und Stärke des magnetischen Moments. Die Eigenschaften einer sehr dichten und homogenen Polymerhülle werden so erfüllt. Eine Ankopplung von Aminosäuregruppen und Antikörpern ist möglich.

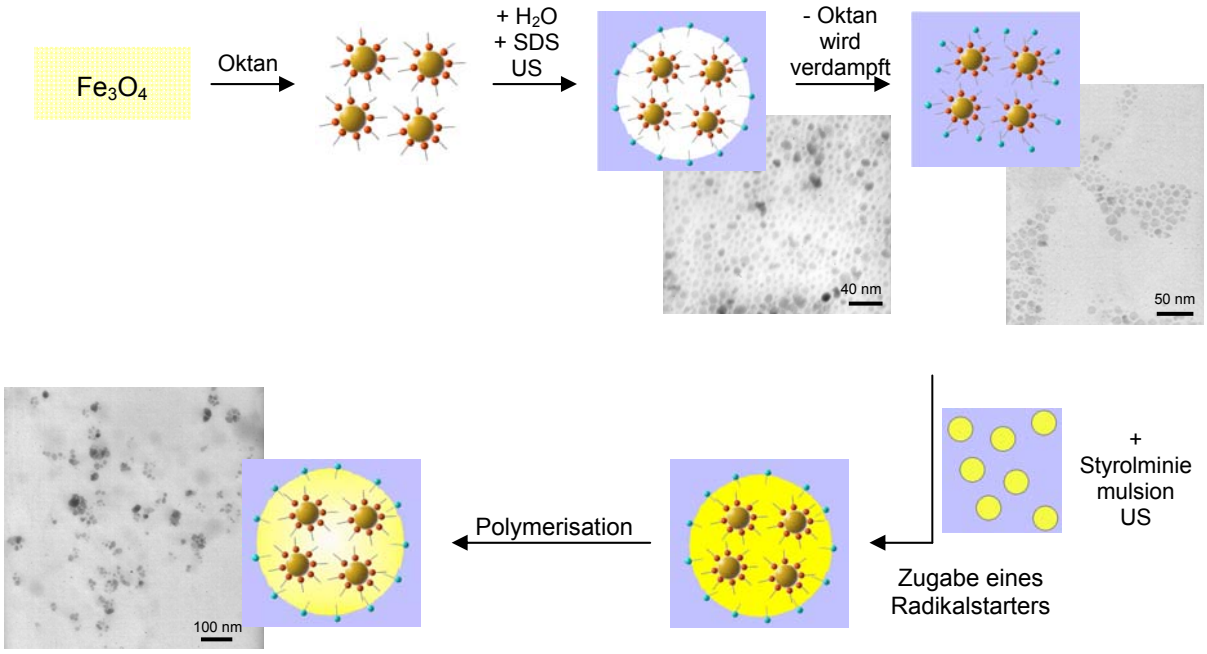


Abbildung 4: Synthese magnetischer Polystyrolpartikel; Mittels Schockfällung werden aus einer $FeCl_2/FeCl_3$-Lösung Magnetitpartikel mit einem Durchmesser von ungefähr 10 nm erhalten.

2.3 *Eigenschaften einzelner Nanopartikel und Zellaufnahme*

Die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen kann durch die Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel mit Polymeren beeinflusst werden. Als Hüllmaterialien für Nanopartikel werden häufig Dextranderivate [126], Polyethylenglykol (PEG) [127], Polyethylenoxid (PEO) [25], Methacrylate [128], Poloxamere und Poloxamine [129-131] verwendet. Bei Dextranhüllen kann es bei biomedizinischen Anwendungen nach Injektion in den Blutkreislauf zu Protein-Nanopartikel-Interaktionen kommen, die fatale Folgen für den Organismus haben können [30]. Dabei kann die Wechselwirkung der Partikel mit den Serumproteinen zur Koagulation führen. Diese Koagulate können sich an der Gefäßwand ablagern und zu Arteriosklerose führen. Poloxamine hingegen sorgen dafür, dass die Nanopartikel bei *in vivo*-Anwendungen lange im Blut zirkulieren und den Transport der Partikel in die Leber verringern. Polysorbate müssen in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um den gleichen Effekt zu erreichen [132]. Andere Polymere, die die Aufnahme von Nanopartikeln in die Zelle erhöhen, sind meist positiv geladene kationische Moleküle, sogenannte Transfektionsmittel. So erhöhen Moleküle wie Superfect, DOTAP (1,2-

dioleoyl-3-trimethylammonium-propan), Lipofectamin, PEI (Poly(ethylenimin)) [133, 134], Protamin [134, 135] und Poly-L-lysin [134, 136-138] die Partikelaufnahme. Diese werden adsorptiv an die Oberfläche gebunden, wobei sie aufgrund mangelnder Selektivität der bindenden Proteine instabil sind.
Eine wesentlich effektivere Methode ist die kovalente Bindung funktioneller Moleküle. Die Arbeitsgruppe von Wilhelm konnte 2003 zeigen, dass anionische superparamagnetische Nanopartikel dreimal so gut aufgenommen werden wie Nanopartikel mit Dextranhülle [139]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die spezifische Bindung von Antikörpern wie dem HIV-1 Tat-Peptid oder Antennapedia eine gute Transfektionseffizienz in Zellen ermöglicht [140]. Diese Peptide sind selbst kationisch und könnten den Internalisationsprozess in die Zelle durch Bindung an die anionische Zellmembran ermöglichen [141, 142]. Wurden Nanopartikel aus Poly-(lactid-co-Glykolsäure) (PLGA) mit Vitamin E funktionalisiert, ergab sich eine höhere Partikelaufnahme in die Zellen als mit Polyvinylalkohol beschichteten PLGA-Nanopartikeln [143]. Nanopartikel mit einer PEG (Polyethylenglykol)-Hülle wurden mit Folsäure (FA: folic acid) konjugiert und es wurden nach Inkubation mit HeLa-Zellen höhere Aufnahmeraten gefunden als bei Nanopartikeln mit PEG- oder Dextranhülle, die nicht konjugiert waren [145].
Polyalkylcyanacrylate sind bioabbaubar und werden in der Medizin zum Beispiel als Gewebekleber [146, 147] eingesetzt. Sie eignen sich aber auch als Trägersysteme für Medikamente, die intrazellulär in Lysosomen freigesetzt werden können [115]. Nach ersten erfolgreichen *in vitro*- Versuchen mit Polysorbat 80 beschichteten PMMA (Polymethylmetacrylat)- Partikeln [65] konnten Medikamente mittels Polysorbat 80 modifizierten Poly(n-butylcyanacrylat)-Nanopartikeln ins Mausgehirn transportiert und dort freigesetzt werden [67-71, 90, 148]. PEGylierte Polycyanacrylat-Nanopartikel scheinen aufgrund ihrer langen Zirkulationsdauer im Blutstrom und der hohen Anreicherung im Gehirn gut zur Bekämpfung neurodegenerativer Krankheiten geeignet zu sein [83].

2.4 Magnetische Nanopartikel

Die Eigenschaften magnetischer Nanopartikel machen diese für biomedizinische Anwendungen sehr interessant. Ihre Oberfläche kann für eine spezielle Interaktion funktionalisiert werden und ihre magnetischen Eigenschaften ermöglichen die Kontrolle durch ein externes magnetisches Feld. Magnetitpartikel sind meist als Ferrofluide in Wasser oder Öl gelöst und durch Tenside stabilisiert. Sie sind superparamagnetisch und zeigen nach dem Anlegen eines hohen magnetischen Wechselfeldes nur eine geringe Hysterese. Die Partikel aggregieren nach Anlegen

eines Magnetfeldes nicht miteinander, sie bilden also stabile Dispersionen. Diese Eigenschaft ist für den Einsatz der Partikel in lebenden Organismen von größter Bedeutung, da die Partikelkoagulationen und Aggregate in Blutgefäßen zu Arteriosklerose führen könnten. Die Partikel werden außerdem durch eine hydrophile Polymerhülle, zum Beispiel Dextran oder Albumin, stabilisiert. Für biomedizinische Anwendungen müssen die Partikel stabil bleiben und der Magnetit darf nicht gleich nach der Injektion angegriffen und in die Leber transportiert oder durch Makrophagen entsorgt werden.

Diese Kontrollierbarkeit der Partikel macht sie für die magnetische Zelltrennung [149, 150] interessant. Sie werden aber auch für weitaus komplexere Methoden zum Beispiel als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) [149, 151-153] eingesetzt. Dadurch wird die Diagnostik vieler Krankheiten erleichtert. Die durch das Anlegen eines Magnetfeldes resultierende Erwärmung kann zur gezielten Zerstörung von Gewebe wie z.B. Tumoren genutzt werden. Dies wird auch als Hyperthermie [154-156] bezeichnet.

Unter den magnetischen Materialien mit geeigneten Eigenschaften ist Magnetit die einzige Substanz, die für klinische Anwendungen zugelassen ist. Superparamagnetische Magnetitpartikel besitzen eine sehr geringe Toxizität in der für biomedizinische Anwendungen benötigten Konzentration und werden relativ schnell über die Leber und Nieren ausgeschleust. 16-21% des Eisens sind nach 84 Tagen wieder ausgeschieden [157]. Ein Teil des Eisens wird auch in den Köperstoffwechsel eingeschleust. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIO) sind kommerziell erhältlich und für humane Anwendungen zugelassen [158, 159].

Nanopartikel, die kommerziell vermarktet werden, müssen in allen biomedizinischen Anwendungsbereichen eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel sollen möglichst gleichmäßige magnetische Eigenschaften besitzen. Bisher gibt es eine Reihe käuflicher superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel für biomedizinische Anwendungen. Hier sind die MRT-Kontrastmittel Resovist® und Feridex©, sowie die Eisen-oxidnanopartikel MFH®300F, die zur Hyperthermie eingesetzt werden können, zu nennen.

Magnetitpartikel, die durch hydrophile Polymere stabilisiert sind, sind klein genug, um Zellen oder die Blut-Hirnschranke [160] zu durchdringen. Eine Markierung neuronaler Systeme mittels superparamagnetischer Nanopartikel und eine Wirkstofffreisetzung aus diesen ist bereits gelungen [75-78]. Auch die regenerative Medizin hat neue Therapien entwickelt, die den Einsatz von Zellen mit einem hohen Regenerationspotential wie zum Beispiel Stammzellen zur Regeneration zerstörten Gewebes vorsehen. Um die Wirkungsweise der injizierten oder transplantierten

Zellen zu charakterisieren und damit auch den Nutzen der neuen therapeutischen Anwendungen besser abschätzen zu können, sind Migrationsstudien der transplantierten Zellen von großer Bedeutung. Zur Detektion der Zellen im Organismus mittels MRT werden hierbei meistens auch superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel eingesetzt.
Viele Studien haben die Unterschiede zwischen SPIOs und ultrakleinen SPIOs (USPIO) untersucht und festgestellt, dass USPIOs hinsichtlich der Zellmarkierung gegenüber SPIOs unterlegen sind [144, 161, 162].
Superparamagnetische Nanopartikel, wie das kommerzielle Kontrastmittel Resovist® oder Feridex© mit einer wasserlöslichen Polymerhülle (z.B. Dextran) sind abbaubar. Bereits im Blutstrom kann es zu Aggregationen der Partikel kommen, wobei ein Abstreifen der Polymerhülle möglich ist. Durch den Verlust der Polymerhülle könnte es zur Aggregation der Partikel kommen. Eine hydrophobe Polymerhülle (z.B. Polyurethan) ist im wässrigen Milieu (z.B. Blut) stabiler. Ein weiteres Beispiel für eine stabile Polymerhülle ist Polystyrol, da es nicht bioabbaubar und daher für Langzeitanwendungen geeignet ist, ein Nachteil ist jedoch, dass es nicht biokompatibel und daher nicht für klinische Anwendungen zugelassen ist.

2.5 Zellsysteme für biomedizinische Anwendungen

Körperzellen, die über längere Zeit teilungsfähig und noch undifferenziert sind, werden als Stammzellen bezeichnet. Stammzellen sind aufgrund ihres hohen Regenerationspotentials für biomedizinische Anwendungen besonders interessant. Es wird zwischen totipotenten und pluripotenten Stammzellen unterschieden (Abbildung 5). Totipotente Zellen wie die Zygote und das 4-Zell-Stadium können einen gesamten ausgewachsenen Organismus bilden. Pluripotente Zellen sind dazu nicht mehr fähig, sie können aber alle Zelltypen eines ausgewachsenen Organismus ausbilden. So können pluripotente Zellen bei der *in-vitro*-Fertilisation aus den Blastozyten erhalten werden.
Multipotente Zellen, auch als adulte Stammzellen bezeichnet, kommen in fast allen Organen ausgewachsener Organismen vor und besitzen ein eingeschränktes Differenzierungspotential, sie können sich in ihrer Umgebung nicht ohne Weiteres in jede Art von Zellen differenzieren, sondern sind auf ein spezifisches Gewebe beschränkt. Zu den multipotenten Zellen zählen hämatopoetische, neuronale und mesenchymale Stammzellen.
Als klassische adulte Stammzellen gelten die hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Die Zellen werden aus dem Knochenmark oder Blut isoliert. *In vivo* können sich diese Zellen kontinuierlich teilen, *in vitro* wachsen sie nicht adhärent. In der

klinischen Routine werden sie bei hämatologischen Erkrankungen wie Leukämie, Lymphomen oder multiplen Myomen im Rahmen der autologen und allogenen Transplantation eingesetzt [163-166]. Seit der Entdeckung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Knochenmarks und anderer nicht-hämatopoetischer Stammzellen wie den endothelialen Stamm-/Progenitorzellen (EPC), Satellitenzellen (adulte Skelettmuskelstammzellen), neuralen Stammzellen und kardialen Progenitorzellen wurde versucht, effektivere Therapien für degenerative Erkrankungen zu finden [167]. Das hohe Differenzierungs- und Regenerationspotential dieser Stammzellpopulationen bietet vielversprechende Möglichkeiten für die regenerative Medizin, z.B. für die Regeneration von Herzmuskelgewebe (z.B. nach Herzinfarkt), Leber- oder Knorpelgewebe. Es gibt Hinweise auf eine verbesserte Herztätigkeit nach Herzinfarkt durch die Injektion von Stammzellen in das Infarktareal [168]. Durch diese Methode soll der Vorteil eines minimal-invasiven Eingriffs genutzt werden. Einige klinische Studien befassen sich schon mit der Regeneration des Herzmuskels nach Herzinfarkt durch Stammzellen [158, 168-176]. In einem Schweinemodell konnte durch Markierung von MSCs mit dem Kontrastmittel Feridex© (Endorem) und dem Transfektionsmittel Poly-L-Lysin (PLL) nach anschließender Injektion in ein Infarktareal mittels MRT das zerstörte Gewebe als hyperintenses Signal dargestellt werden [158].

Auf diese Weise sind verschiedene Zelllinien und Stammzellen wie hämatopoetische Stammzellen (HSC) erfolgreich mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln markiert worden [177]. Dabei wurden käufliche Kontrastmittel verwendet und zusätzlich polykationische Transfektionsmittel eingesetzt [134, 135, 138, 152, 158, 159, 178]. Hierbei wurden Unterschiede in der Effizienz der Transfektion bei verschiedenen Zelllinien gefunden [179]. Es stehen auch verschiedene experimentelle, nanopartikuläre Transfektionsmittel wie Liposomen und Dendrimeren zur Verfügung [180-183].

Es gibt noch viele ungeklärte Fragen, die z.B. die Wanderung von Zellpopulationen im Organismus, das sogenannte „Cell homing“ betreffen. Man kann zum Beispiel die Migration von Immuneffektoren wie T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) im Menschen bisher nicht verfolgen. Bioverteilungsanalysen sind daher von höchster Bedeutung [184]. Auch der Verbleib dendritischer Zellen, die zur Generierung von Tumorvakzinen eingesetzt werden, um Immunantworten gegen bestimmte Proteine von Tumoren zu erzeugen, ist von Interesse [185].

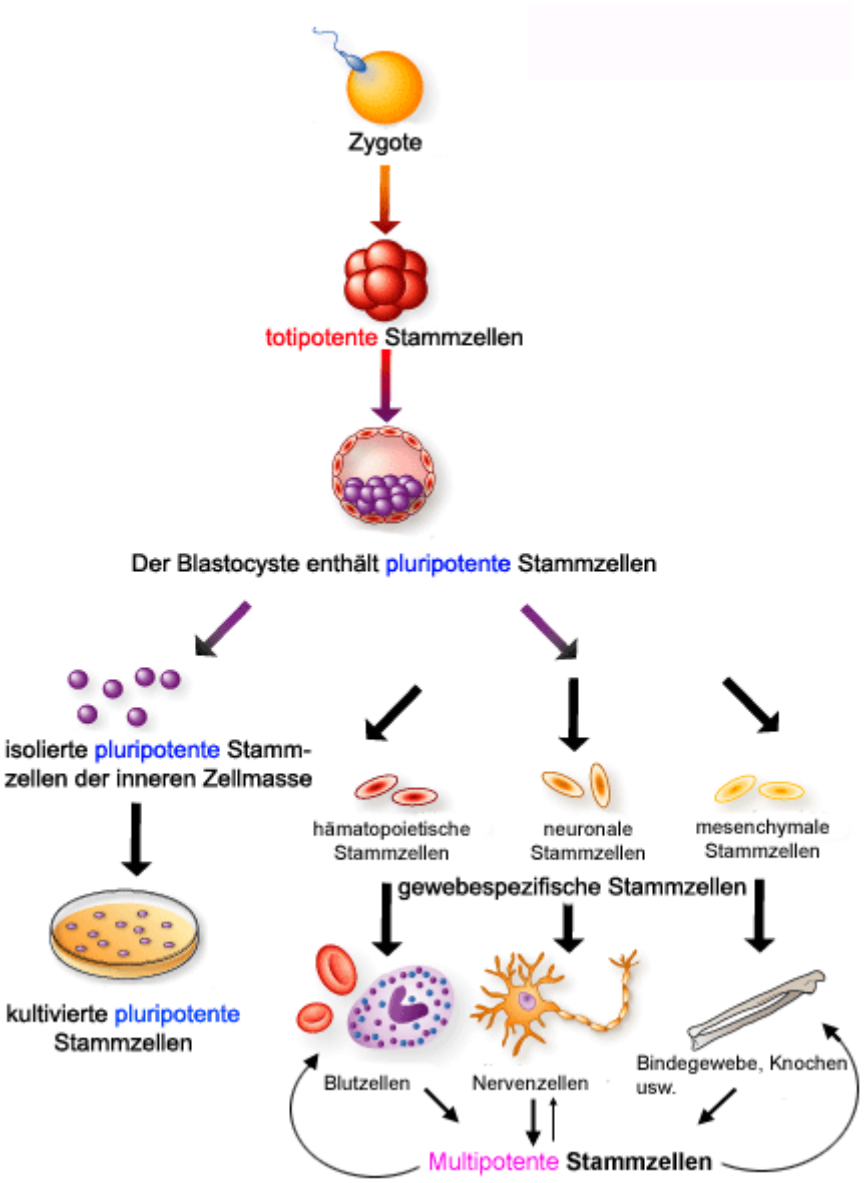


Abbildung 5: Übersicht über Stammzellen [186].

2.6 Zelluläre Aufnahmemechanismen

Aufgrund der Barrierefunktion der Zellmembran können nur kleinere Moleküle die Zellmembran passiv durchdringen, während größere Moleküle nur mittels spezieller Aufnahmemechanismen in die Zelle gelangen können. Diese Aufnahmemechanismen werden unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst. Dabei unterscheidet man zwischen Phagozytose und Pinozytose, Clathrin-abhängiger, Caveolae-vermittelter und Clathrin-unabhängiger Endozytose (Abbildung 6). Bei der Phagozytose werden extrazelluläre feste Partikel verschiedener Größe in die Zelle aufgenommen. Die Phagozytose wird in drei Schritte eingeteilt: Zunächst erfolgt die Anlagerung, dann die Einverleibung und zuletzt die intrazelluläre

Verdauung körperfremden Materials. Damit die Zelle ihre Nahrung in dem sie umgebenden Medium von anderen unverdaulichen Fremdpartikeln unterscheiden kann, müssen Oberflächenantigene der aufzunehmenden Partikel an membranständige Rezeptoren der Zelle andocken. Die Aufnahme der Partikel kann ohne Formveränderung der Zelle durch ein Umfließen der extrazellulären Partikel mit Pseudopodien oder durch einen Einstülpungsvorgang, auch als Invagination bezeichnet, erfolgen. Die Membraneinstülpung vergrößert sich dadurch, und der Partikel wird in Phagosomen eingeschlossen und in die Zelle aufgenommen. Lysosomen, die Verdauungsenzyme enthalten, verschmelzen dann mit den Phagosomen zu sogenannten Phago-Lysosomen. Phago-Lysosomen besitzen einen niedrigen pH-Wert, da die Verdauungsenzyme erst bei niedrigem pH-Wert ihr Optimum besitzen. Phagozytose tritt nur bei spezialisierten Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen sowie bei Amöben auf [187-190].

Pinozytose ist ein kontinuierlicher Prozess zur Aufnahme von Flüssigkeitsmengen und den darin gelösten Substanzen und erfolgt via „Clathrin coated pits“ (beschichtete Gruben). Sie tritt in fast allen Zelltypen auf. Es werden Vesikel von meist 100 nm gebildet [191]. Caveolae-vermittelte Endozytose von kleineren Molekülen wie zum Beispiel Folat erfolgt über die Caveolae, plasmalemmale Invaginationen, die in fast allen Zelltypen vorkommen [192] und über die noch sehr wenig bekannt ist.

Für kleinere Moleküle und Makromoleküle wurden bereits Aufnahmemechanismen wie die rezeptorvermittelte Endozytose bei Hormonen, Toxinen und Transportproteinen sowie bei Antikörpern und Cholesterin beschrieben [193, 194]. Es sind einige Rezeptoren wie Opsonin-, Lectin- und Scavenger-Rezeptoren bekannt, die bei der rezeptorvermittelten Endozytose eine Rolle spielen [195]. Für größere Partikel in einem Größenbereich von wenigen bis hunderten Nanometern sind die möglichen Endozytosewege wie rezeptorvermittelte Endozytose, Pinozytose sowie Phagozytose, bisher noch nicht genau verstanden [196].

Obwohl der bestimmende Faktor für intrazelluläre Aufnahme die Partikeloberfläche darstellen dürfte [139], gibt es kaum Studien, die Oberflächenladung von Partikeln oder Substanzen in einem größeren Bereich variieren.

Diese Arbeit befasst sich mit der Aufnahme von Partikeln im Nanometerbereich als Funktion ihrer Oberflächenladung. Von besonderer Bedeutung sind neben der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen auch ihr Verbleib und der Abbau in intrazellulären Kompartimenten.

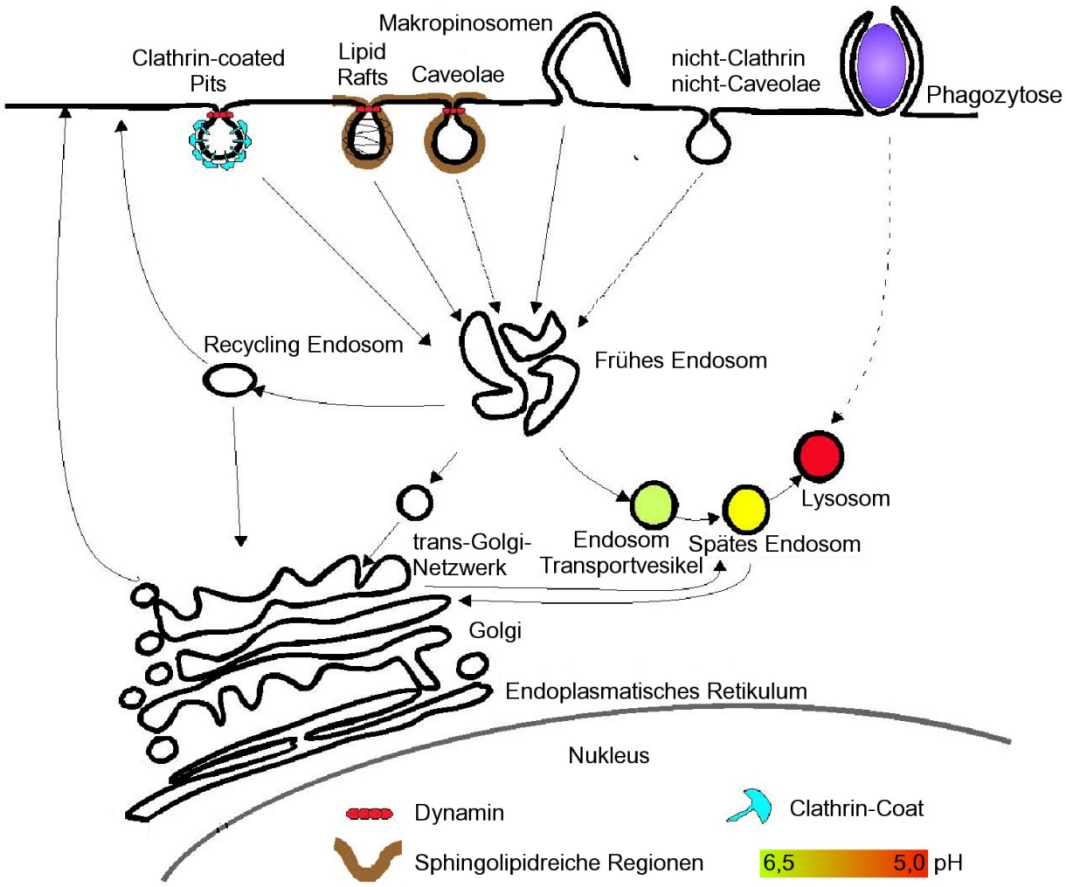


Abbildung 6: Übersicht über den intrazellulären Membrantransport [197].

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden erläutert. Neben der FACS (Fluoreszenz-aktivierter-Zell-Sorter)-Analyse soll das TEM (Transmissionselektronenmikroskop), das SEM (Rasterelektronenmikroskop) und das CLSM (konfokales Laser Scanning Mikroskop) vorgestellt werden. Auch auf die quantitative Eisenbestimmung mittels Ferrozin-Test [198-200], sowie die Berliner-Blaufärbung zum Eisennachweis soll hier eingegangen werden.

3.1 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Das FACS (fluorescence activated cell sorter) ist eine durchflusszytometrische Methode und wird in der Biologie und der Medizin eingesetzt. Der Name ist eine geschützte Handelsmarke von Becton Dickinson. Obwohl in dem Ausdruck FACS der Begriff Sorter vorkommt, werden zumeist keine Zellen sortiert, sondern vielmehr eine Messung der Eigenschaften individueller Zellen in einem Zellgemisch vorgenommen. Das Verfahren beruht auf der Emissionsmessung von optischen Signalen der Zelle. Dabei trifft ein Laserstrahl im Sensormodul auf Zellen, die in einer Lösung nacheinander durch eine Kapillare gesaugt werden, und es entstehen Lichtbeugung und –streuung (Vorwärtsstreuung (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreuung (SSC, sideward scatter).
Sind die Zellen zum Beispiel mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, so werden beim Auftreffen des Laserstrahls Fluoreszenzsignale emittiert (siehe Abbildung 7). Diese Signale werden von Detektoren (Photomultipliern) aufgenommen und verstärkt. Um die Zellen in unterschiedliche Fraktionen einzuteilen, sind zwei morphologische Eigenschaften, das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Granularität, erforderlich. Die Zellen können noch weiter charakterisiert und eingeteilt werden, indem Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmerkmale der Zellen eingesetzt werden. Mit Hilfe verschiedenfarbiger Laser können auch unterschiedliche Farbstoffe eingesetzt werden und damit der Informationsgehalt erhöht werden. In relativ kurzer Zeit (wenige Sekunden), können so etwa 10000 Zellen untersucht werden. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden dann verschiedenen Fluoreszenzdetektoren zugeführt.
Das FACS-Gerät wird in der klinischen Routinediagnostik, der Infektiologie, Immunologie und Hämatologie, sowie für medizinische und biologische Fragestelllungen der Grundlagenforschung eingesetzt.
Der Einsatz von Durchflusszytometern mit einer Trenneinrichtung ermöglicht die

Isolation individueller Zellpopulationen aus Zellgemischen aufgrund bestimmter Eigenschaften der Zellen (zum Beispiel verschieden fluoreszierende Antikörper gegen Zelloberflächenproteine). Am Abrisspunkt bricht der Flüssigkeitsstrahl auf und es bilden sich Tröpfchen. Zur Zelltrennung werden diese Tröpfchen dann aufgrund der verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften der Zellen mit einer bestimmten Ladung versehen, indem kurzfristig der gesamte Flüssigkeitsstrahl aufgeladen wird. Die Tröpfchen gelangen durch ein elektrisches Feld und werden über geladene Ablenkplatten in das jeweilige Auffangröhrchen abgelenkt.

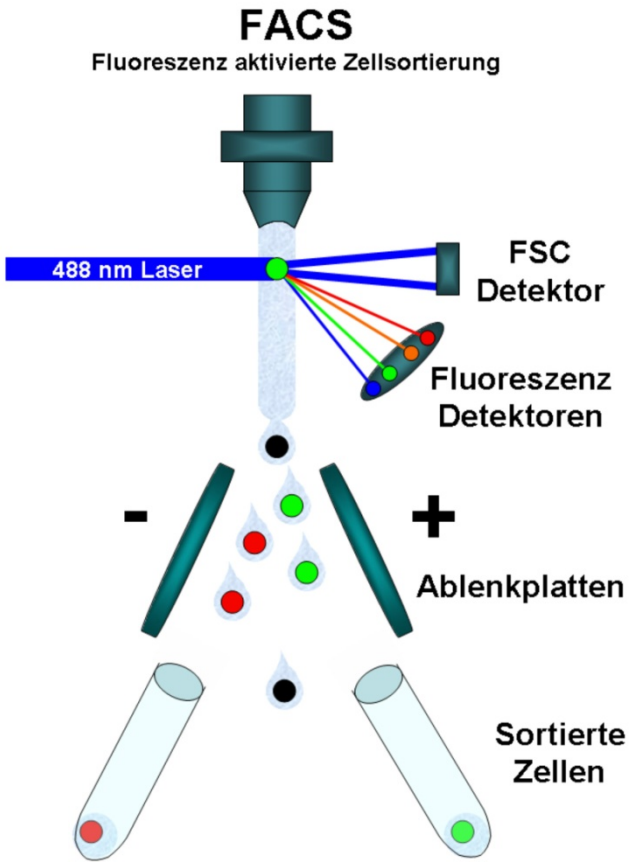
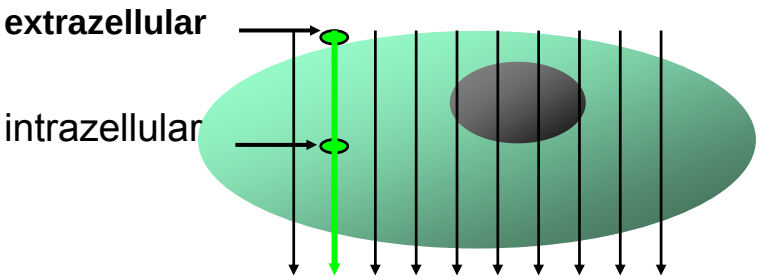


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt das Prinzip eines Durchflusszytometers mit Sorteinrichtung. Ein Laserstrahl trifft auf fluoreszenzmarkierte Zellen, die mit Druck in einer Trägerflüssigkeit durch eine Kapillare gepresst werden.

3.2 *Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM confocal laser scanning microscope)*

Bei klassischen Fluoreszenzmikroskopen entsteht das Bild aus einer Überlagerung aus einer scharfen Abbildung der Punkte innerhalb der Fokusebene und einer unscharfen Abbildung der Punkte außerhalb dieser, weiterhin ist die Fokusebene sehr dick. Fluoreszenzsignale werden auch außerhalb der Fokusebene detektiert. Auf diese Weise kann nicht eindeutig zwischen intra- und extrazellulärem Signal unterschieden werden (Abbildung 8 A). Wenn eine verbesserte Auflösung in z-Richtung erforderlich ist, muss ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) verwendet werden. Bei dem CLSM wird der Laserstrahl in einer Ebene durch ein Objektiv so stark fokussiert, dass nur noch ein Pixel angeregt wird (Abbildung 8 B). Optische Signale, die nicht aus der Fokalebene kommen, werden von einer Lochblende ausgeblendet. Licht aus diesem Fokus gelangt durch das gleiche Objektiv auf eine Lochblende und wird dann auf einen Detektor, meist einen Photomultiplier, geleitet. Anregungs- und Detektionsfokus liegen übereinander, konfokal (siehe Abbildung 9).

A: Herkömmliches Fluoreszenzmikroskop



B: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLSM)

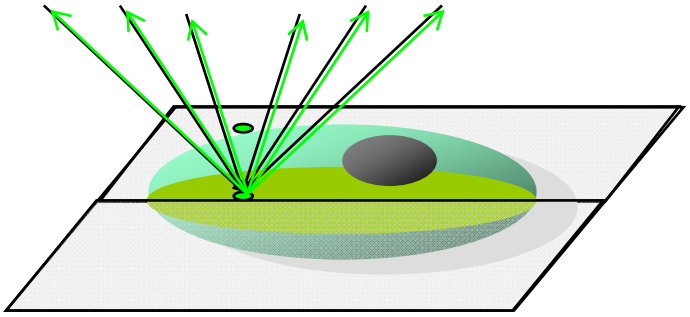


Abbildung 8: A: Strahlengang durch eine Zelle bei einem herkömmlichen Mikroskop. Es kann hier nicht zwischen intra- und extrazellulärem Fluoreszenzsignal unterschieden werden, da auch optische Signale außerhalb der Fokalebene bei der Bildentstehung mitverarbeitet werden. B: Schema des Strahlengangs beim CLSM. Der Laserstrahl wird so stark in einer Ebene fokussiert, dass nur ein Pixel angeregt wird.

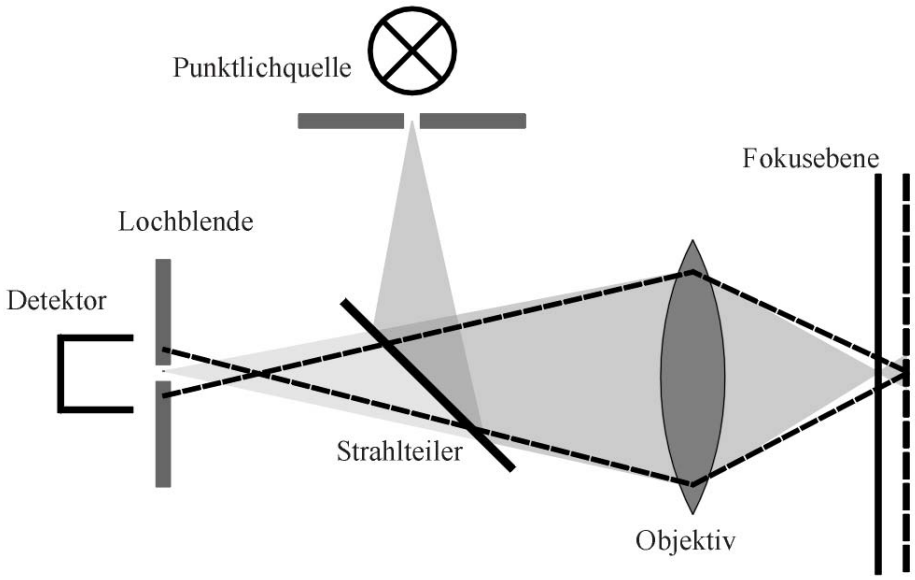


Abbildung 9: Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Das Anregungslicht wird so stark gebündelt, dass nur ein Pixel des Objektes angeregt wird. Meist wird Licht aus diesem Pixel durch dasselbe Objektiv auf eine Lochblende abgebildet und von dort auf einen Detektor geleitet. Dabei liegen Anregungs-und Detektionsfokus übereinander (konfokal). Optische Informationen, die nicht aus der Fokalebene (durchgezogene Linie) kommen, sondern aus einer Ebene versetzt dazu (gestrichelte Linie), werden nicht auf die Lochblende fokussiert. Sie wird fast vollständig geblockt. Die gestrichelte Linie zeigt dies in der Abbildung für einen Punkt. Außerdem werden optische Signale außerhalb der Fokalebene schwächer berücksichtigt, da hier die Beleuchtungsintensität sehr schwach ist.
[201]

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Untersuchung von Gewebeproben oder anderem Zellmaterial muss zunächst eine umfangreiche Präparation erfolgen. Da ein Vakuum aufgebaut werden muss, in dem der Elektronenstrahl ohne Störung durch Luftmoleküle auf die Probe gelenkt werden kann, können keine lebenden biologischen Proben mittels Transmissions-elektronenmikroskopie untersucht werden. Die Probe muss zunächst fixiert werden. Die Fixierung erfolgt mit Glutaraldehyd, wobei die Proteine vernetzt werden. Anschließend kommt Osmiumtetroxid zur Kontrastierung zum Einsatz. Osmiumtetroxid wirkt gleichzeitig auch als Fixierungsmittel. Nach Zugabe von Osmiumtetroxid reagiert dieses mit Äthylengruppen ungesättigter Lipide, wobei reduziertes Osmium entsteht, das beim Ausfallen zu der Kontrastgebung führt. Es

werden zyklische Monoester gebildet. Reagieren Monoester mit Glykolgruppen, so entstehen beständige Diester, die eine stabile Vernetzung mit Lipiden ermöglichen. Bei der anschließenden Dehydrierung wird das Wasser schrittweise durch Ethanol ersetzt. Die Proben werden nun in Kunstharze wie zum Beispiel Epon eingebettet, so dass sie in ultradünne Scheiben geschnitten werden können. Diese Ultradünnschnitte werden auf ein Metallgitterplättchen aufgebracht. Bei der Analyse der Proben im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wird das Probenmaterial vom Elektronenstrahl durchstrahlt. Das Probenmaterial muss aus diesem Grund sehr dünn sein. Die Probendicke kann je nach der Höhe der Beschleunigungsspannung, der erforderlichen Auflösung und der Ordnungszahl der Atome, aus der die Probe besteht, von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern variiert werden. Wird die Brennebene der Objektivlinse vergrößert abgebildet (bei Objektiv und einem Projektiv), so entstehen im Abbildungsmodus zwei Beugungs- und zwei Ortsraumbilder (Abbildung 10). Aus dem Elektronenbeugungsbild kann dann bei einer kristallinen Probe die Kristallstruktur der Probe bestimmt werden. Bei geringerer Anregung der Projektivlinse (Erhöhung der Brennweite) erfolgt eine Verschiebung des zweiten Beugungsbildes nach unten, so dass es am Detektor registriert werden kann (Beugungsmodus). Um die Kontrastierung der geschnittenen Proben zu erhöhen, kann eine Blei-, Osmiumtetroxid- oder Uranylacetatfärbung erforderlich sein.

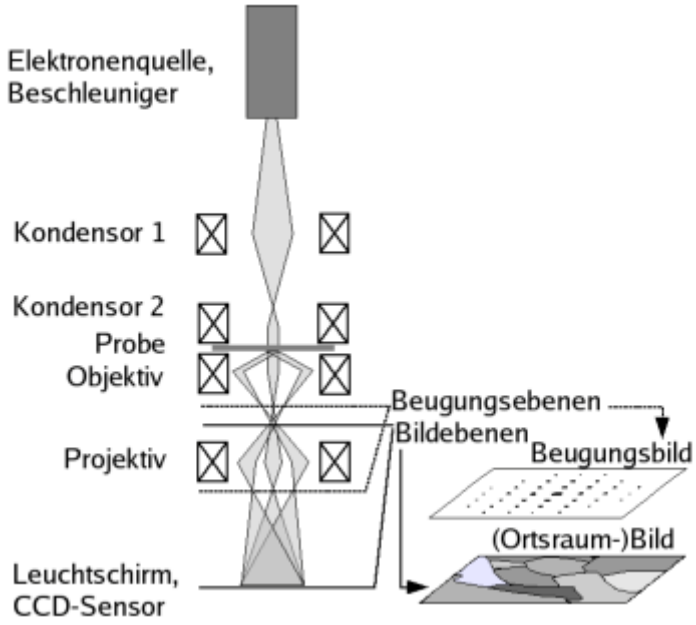


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt den Strahlengang einer kristallinen Probe. Es entstehen im Abbildungsmodus zwei Beugungs- und zwei Ortsraumbilder, da das Abbildungssystem ein Objektiv und ein Projektiv besitzt. Wird die Brennweite erhöht, so kommt es zu einer Verschiebung des Beugungsbildes nach unten und zu einer Registrierung am Detektor. [202]

3.4 Rasterelektronenmikroskopie (englisch SEM: Scanning Electron Microscope)

Beim Rasterelektronenmikroskop (SEM, Abbildung 11) wird ein feingebündelter Primärelektronenstrahl zeilenweise über die Objektoberfläche gelenkt (Rastern). Die dabei auftretenden Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt dienen der Erzeugung eines Bildes des Objektes. Dabei werden Elektronen aus dem Objekt angeregt und verlassen dieses. Es handelt sich dabei um die so genannten Sekundärelektronen. Der Elektronenstrahl wird mittels Magnetspulen auf einen Punkt auf der Probe fokussiert. Ein Hochvakuum verhindert Störungen durch Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen der Luft. Die erzeugten Bilder sind Abbildungen der Objektoberflächen und besitzen eine höhere Schärfentiefe als mit Durchlichtmikroskopen erzeugte Bilder. Der Elektronenstrahl wird entweder in einem haarnadelförmigen Wolframdraht oder einem LaB6-Kristall durch Erhitzen erzeugt. Magnetspulen lenken dann den Elektronenstrahl auf einen Punkt (Fokussierung). Insbesondere biologische gefriergetrocknete Präparate sind schlechte elektrische Leiter, die sich im Elektronenstrahl elektrisch aufladen. Dadurch entstehen Artefakte. Um eine derartige Artefaktbildung zu verhindern, wird die Objektoberfläche mit einem leitenden Metall (Gold oder Platin) oder Kohlenstoff bedampft.

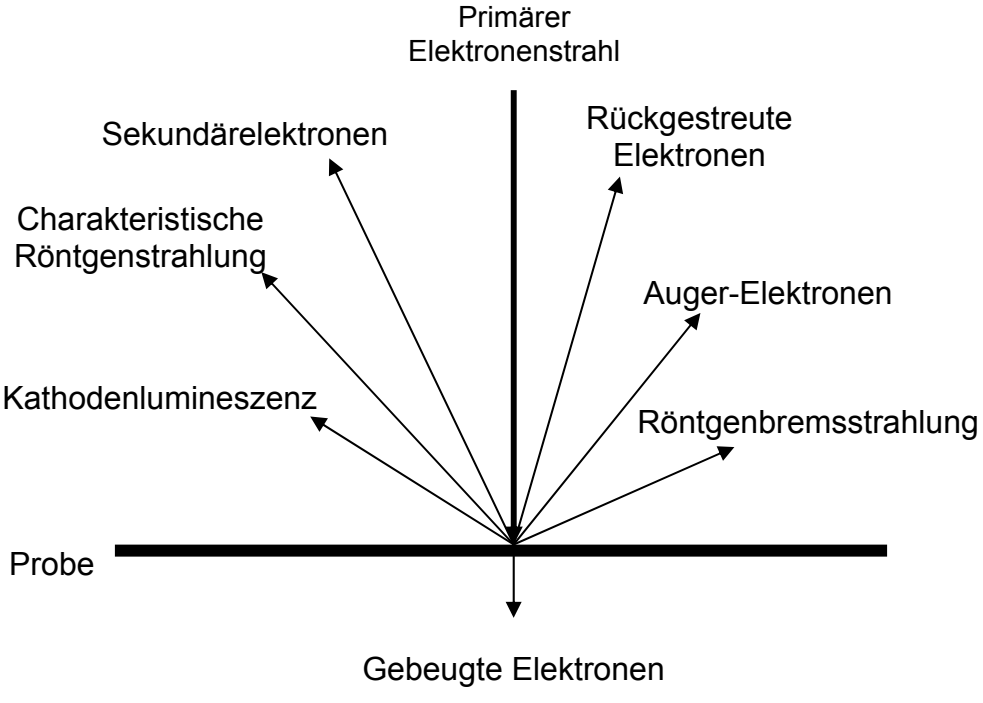


Abbildung 11: Das Schema zeigt die Entstehung verschiedenster Signale am SEM, wenn der primäre Elektronenstrahl auf eine Probe trifft. Zumeist werden Sekundärelektronen genutzt, um eine sehr hohe Auflösung zu erreichen. Zurückgestreute Elektronen, die von dem Objekt reflektiert werden, dienen der Charakterisierung des Objektmaterials, da schwere Elemente zu einer starken Rückstreuung führen.

3.5 Berliner-Blaufärbung

Um 1704 wurde Preußisch-Blau (Berliner-Blau) von dem Berliner Chemiker und Farbenhersteller Heinrich Diesbach zufällig entdeckt, als dieser bei der Produktion eines roten Farbstoffes den Ersatzstoff „Dippels Tieröl“ verwendete. Der neue Farbstoff wurde zunächst unter dem Namen Pariser-Blau als der erste moderne synthetische Farbstoff vertrieben. Berliner Blau ist ein lichtechtes tiefblaues Pigment. Die Bezeichnung Preußisch-Blau entstand durch das Färben der preußischen Uniformröcke im 18. Jahrhundert.
Bei der Berliner-Blaufärbung oder Preußisch-Blaufärbung wird freies ionisches Fe^{3+} mittels Kaliumhexacyanoferrat (Fe^{2+}) nachgewiesen. Bei der Reaktion entsteht eine Blaufärbung:

$4Fe^{3+} + 3[Fe(CN)_6]^{4-} \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ unlöslich, blau

3.6 Ferrozin-Test

Der Ferrozintest ist eine nasschemische Methode zur Bestimmung von Eisen und wurde von Stookey 1970 entwickelt. Zur Bestimmung der Fe (II)-Konzentration wird Ferrozin (Na_2-3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure)-1,2,3-Triazin) eingesetzt. Drei Ferrozinmoleküle bilden dabei mit einem Fe^{2+}-Ion einen purpurfarbenen, wasserlöslichen Komplex, der einen Extinktionskoeffizient von ε_{562nm}= 27900 $M^{-1}cm^{-1}$ besitzt. Die Reaktion läuft bei einem pH von 4 bis 9 ab. Die Absorption des Komplexes liegt bei 562 nm und wird zur Quantifizierung des Eisens gemessen.

3.7 Magnetresonanztomographie (MRT)

Unter Magnetresonanztomographie oder auch Kernspintomographie versteht man ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung innerer Organe und Gewebe. Die MRT wurde in den 1970er Jahren von Paul C. Lauterbur und Peter Mansfield als bildgebende NMR entwickelt. Dabei nutzt das Verfahren magnetische Felder und Radiowellen aus. Der Kernspin-Tomograph erzeugt ein sehr starkes Magnetfeld, wobei sich die magnetischen Dipolmomente der Kernspins in den Atomen des Organismus parallel oder antiparallel zum Magnetfeld ausrichten. Da der Körper zu mehr als 70% aus Wasser besteht und das Wasserstoffatom einen Kernspin (Eigendrehimpuls) besitzt, kommt diesem bei der MRT-Messung eine besondere

Bedeutung zu. Der Kernspin des Wasserstoffatoms wird im Magnetfeld also entsprechend des magnetischen Feldes, ausgelenkt. Mit Hilfe von Radiowellen, die in kurzen Impulsen auf den Bereich des Körpers gelenkt werden, die abgebildet werden sollen, werden die im Magnetfeld ausgerichteten Wasserstoff-Protonen wieder in Unordnung gebracht und es kommt zur Resonanz. Durch die Abschaltung der gepulsten Radiowellen kehren die Wasserstoff-Protonen in ihre Ausgangsposition zurück. Dies wird als Relaxation bezeichnet. Dabei wird die aufgenommene Energie wieder abgegeben und mit Hilfe einer speziellen Antenne detektiert und im Computer zu einem Bild zusammengesetzt.
Nach dem Abschalten der Radiowellen kehren nicht alle Protonen gleich schnell in ihre Ausgangsposition zurück. Unter der Relaxationszeit versteht man die Zeit, die die Kernspins in den Atomen benötigen, um wieder ihre ursprüngliche Lage zu erreichen. Diese hängt von dem Gewebetyp ab. So ist in Fettgewebe die Relaxationszeit kurz, da die Protonen stärker gebunden sind und daher keine so große Drehung vollführen. Im MRT ist die Signalintensität in diesen Bereichen stärker (hyperintenses Signal). Stark wasserhaltige Gewebetypen wie Hirn oder Muskeln und viele kranke Organe besitzen eine lange Relaxationszeit und zeigen eine niedrige Signalintensität (hypointenses Signal). Hier bleiben die Protonen länger in dem ungeordneten Zustand.

4 Material und Durchführung

Geräte

1,5 Tesla MRT (Symphony mit Ringspule/Fingerspule)	Siemens, Erlangen, Germany
CLSM (confocal laser scanning microscope) (Fluoview auf IX71 mit zwei Lasern (488 nm und 543 nm) und einer 60x Öl-Linse	Olympus Hamburg, Germany
CPD 030 critical point drying apparatus (Bal-Tec)	Fürstentum Liechtenstein
BAF 300 device (Bal-Tec)	Fürstentum Liechtenstein
Biofuge A	Heraeus, Hanau, Germany
Brutschrank	Heraeus Instruments, Stuttgart, Germany
ELISA Reader	SLT Labinstruments, Overath, Germany
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe, Germany
FACS (Fluorescence activated cell sorter), Messprogramm CellQuest 3.0	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Hitachi S-5200 scanning electron microscope	Hitachi, Tokyo, Japan
Hochgeschwindigkeitszellsorter (BD FACS Aria™ Becton)	Dickinson, Heidelberg, Germany
Invertiertes Mikroskop TS100 (Twain Treiber für Nikon DS-U1; Bild geladen mit Corel Draw 12; WD 10x/0.25 und LWD 40x/0.55 Objektive)	Nikon, Tokio, Japan

Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Sterile Pipettenspitzen	VWR, West Chester, USA
Einmalpipetten	Nunc, Wiesbaden, Germany
TEM Philips 400	Fei, Eindhoven, Niederlande
Ultraschallgerät Branson 200 (40 kHz, 220/240V; 50/60 Hz)	Branson, Soest, NL
Varifuge RF	Heraeus, Hanau, Germany
Zellkulturflaschen	Nunc A/S Roskilde, DK

Reagenzien

2.5% Glutharaldehyd (mit 1.5% Saccharose in PBS (pH 7.3), und postfixiert in 2% wässrigem Osmium Tetroxid)	Fluka, Buchs, Schweiz
7-Aminoactinomycin-D	Sigma, München, Germany
Annexin	Pharmingen, Heidelberg, Germany
anti-CD55	BD PharMingen, Heidelberg, Germany
α-MEM (mit 20% FCS, 100 units Penicillin und 100 µg/mL Medium Streptomycin, 1 mM Pyruvat, 0,6% Ciprobay)	Invitrogen, Germany Sigma, München, Germany
DMEM (mit 10% FCS, 100 units Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Buchs, Schweiz
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	Cambrex, Verviers, Belgien
Eisen-Bestimmungs-Kit (Farbtest mit Ferene-S)	Nobiflow Iron, Hitado Diagnostics Möhnesee, Germany
Epon	Fluka, Buchs, Schweiz
FCS	Gibco, BRL, Schottland

Feridex©	Guerbet Sulzbach, Germany
fluoreszierende Mikropartikel (TruCount-Röhrchen)	BD Biosciences, Immunocytometry Systems, San Jose, USA
Gelatine	Sigma, München, Germany
Hämatoxylin-Eosin	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung	Sigma, München, Germany
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Germany
Osmiumtetroxidlösung (2%)	Fluka, Buchs, Schweiz
Perchlorsäure	Aldrich
Poly-L-Lysin (361850 D Light Scattering, Vis: 574500 D) P1524, 25 mg, Lot: 093K5158	Sigma, München Germany
Pyruvat	Sigma, München, Germany
Resovist®	Schering AG, Berlin, Germany
RH414 red fluorescent dye	molecular probes, Eugene OR
RPMI (mit 10% oder 20% FCS, 100 units Penicillin und 100 µg/mL Medium Streptomycin,	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

2 mM L-Glutamine, 1 mM Pyruvat)	
Salpetersäure (70%)	Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat), Reinheit >85%	Merck, Darmstadt, Germany
Streptomycin/Penicillin	Gibco, BRL, Schottland
Trypsin	Gibco, BRL, Schottland

4.1 Zellkultur

HeLa-Zellen wurden in DMEM, das mit 10% FCS, 100 Einheiten/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt wurde, kultiviert. MSCs wurden aus Knochenmarkaspiraten oder Hüftgelenken gewonnen, nachdem die Einverständniserklärung erhalten wurde. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm, Deutschland, genehmigt. Primäre humane MSCs wurden wie bereits beschrieben [203] in Kultur gebracht und in α-MEM, versehen mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin und 100 µg/mL Medium Streptomycin, 1 mM Pyruvat und 0,6% Ciprobay, gehalten. MSCs zeigen ein osteoblastisches, adipogenes und chondrogenes Differenzierungsspotential [203]. Jurkat-Zellen wurden in RPMI mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL und 100 µg/mL Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat gehalten, während KG1a-Zellen in RPMI mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin pro mL und 100 µg/mL Medium Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat gehalten wurden. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Dazu wurden adhärente Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/cm^2 am ersten Tag ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 1.000.000 Zellen/mL ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Partikel in einer Konzentration von 75 µg/mL in das Medium zugegeben. Auf die weitere Zugabe eines Transfektionsmittels wurde, wenn nicht anders erwähnt, verzichtet. Als Transfektionsagenz wurde Poly-L-Lysin (PLL) in einer Konzentration von 1,5 µg/mL Medium verwendet. Feridex® und Resovist® wurden in einer Konzentration von 25 µg Eisen/mL (auch als 1x in den Abbildungen bezeichnet) in das Medium zugegeben. Als Transfektionsmittel wurde PLL (MW 170.000) in einer Endkonzentration von 1,5 µg/mL in das Medium zugegeben. Adhärente Zellen wurden trypsiniert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in PBS (phosphate buffered saline) resuspendiert. Danach erfolgten die Messungen am Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS).

4.2 Fluorescence Activated Cell Sorter

FACS-Messungen wurden an einem FACScan durchgeführt. Jurkat-Zellen, KG1a-Zellen, HeLa-Zellen und MSCs wurden mit Seitwärtsstreuung-Plots versus Vorwärtsstreuung-Plots (SSC/FSC) gemessen. Fluoreszenzmessungen erfolgten im FL1-Kanal. Da die Partikel eine unterschiedliche Menge an Fluoreszenzfarbstoff (eingebetteter Farbstoff (icDye), angegeben als w/w) enthielten, wurde der Mittelwert des FL1-Kanals mittels folgender Formel normalisiert, um die Effizienz der Partikel-

aufnahme zu vergleichen:

$$\text{Normalisiert FL1} = nFL1_{(particle\ X)} = \frac{MeanFL1_{(particle\ X)}}{MeanFL1_{(uncharged\ particle)} \bullet \frac{icDye_{(particle\ X)}}{icDye_{(uncharged\ particle)}}}$$

4.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM)

Eine intrazelluläre Lokalisation der Partikel wurde mittels LSM (Fluoview auf einem IX71, ausgestattet mit zwei Lasern (488 nm und 543 nm) und einer 60x Öl-Objektiv) bestätigt. Fluoreszierende Polymerpartikel wurden bei 488 nm angeregt und in Kanal 1 detektiert (Mirror 570 nm, Filter 530 nm). Während eines zweiten Scandurchlaufes wurde der rot fluoreszierende Farbstoff RH414, der als Marker für Zellmembranen dient, bei 543 nm angeregt und in Kanal 2 detektiert (Filter 565 nm). Nach drei Messdatenerfassungen wurde der Mittelwert gemäß der Kalman-Algorithmen bestimmt.

4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Zellen wurden mit 2,5% Glutaraldehyd, 1% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und in 2%iger wässriger Osmiumtetroxidlösung (Fluka, Germany) nachfixiert. Die Proben wurden dann in 1-Propanol-Gradientenreihen dehydriert, in 1% Uranylacetat gefärbt und in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte (80 nm) wurden mit 0,3% Bleicitrat kontrastiert und an einem Philips 400 TEM bei einer Spannung von 80 kV betrachtet.

4.5 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Die Zellen wurden mit 2,5% Glutaraldehyd, 1% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und dann in 1-Propanol-Gradientenreihen dehydriert. Danach wurden die Proben unter Verwendung eines Kritisch-Punkt-Trockners (CPD 030) getrocknet sowie rotierend in einem BAF 300-Apparat mit Platin-Kohle überzogen [204] (Überzugsdicke: 3 nm). Die Proben wurden an einem Hitachi S- 5200 SEM analysiert.

4.6 Toxizitätstests

HeLa-Zellen wurden mit Anti-CD55 und MSCs mit Anti-CD44 angefärbt. Um tote und apoptotische Zellen identifizieren zu können, wurden diese mit 7-AAD (Detektion in Kanal 3) in einer Konzentration von 28 µg/mL [205] 20 min bei 4 °C im Dunkeln angefärbt. Zur erneuten Analyse und zur Zellzählung wurden die Proben mit einer definierten Anzahl fluoreszierender Mikropartikel behandelt und in Triplets in einem FACScan gemessen.

***4.7** Hochgeschwindigkeitszellsorter*

HeLa-Zellen wurden mit Anti-CD55 angefärbt und tote und apoptotische Zellen mit 7-AAD in einer Konzentration von 28 µg/mL 20 min bei 4 °C im Dunkeln angefärbt. Die lebenden Zellen wurden mit einem Hochgeschwindigkeitszellsorter gesortet und in Röhrchen gesammelt. Alle Ereignisse außerhalb des Gates für lebendige Zellen wurden in einem anderen Röhrchen gesammelt. Die Messungen am Hochgeschwindigkeitssorter wurden von Dr. Markus Rojewski am Institut für Transfusionsmedizin und klinische Immunogenetik durchgeführt. Zur erneuten Analyse und zur Zellzählung wurden die Proben mit einer definierten Anzahl fluoreszierender Mikropartikel versetzt und in Triplets in einem FACScan gemessen.

4.8 Berliner-Blaufärbung

Zur Berliner-Blaufärbung wurden die Zellen 10 min in Methanol fixiert und luftgetrocknet. Dann wurden die Zellen mit frisch angesetzter Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung (2%, mit 0,1 N HCl) 10 min lang gefärbt und 1x mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt, 3x mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Bilder wurden von den gefärbten Zellen mit einem inversen Mikroskop aufgenommen.

4.9 Quantitative Eisen-Messung mit einem Ferrozin-Test

Vor der Messung des Eisengehaltes wurden die Zellen intensiv gewaschen (dreimal vor dem Abtrypsinieren und dreimal danach), um die extrazellulären Nanopartikel zu entfernen. Zur quantitativen Messung wurde ein Aliquot der Zellen mit TruCount Beads in Triplets angefärbt. Hierfür wurden TruCount-Röhrchen mit einer kalibrierten

Anzahl fluoreszierender Mikropartikel verwendet (Beads). Das Kügelchen in den Röhrchen wurde mit 700µL PBS gelöst und 190µL davon in normale FACS-Röhrchen pipettiert. Dazu wurden 10µL von den gesorteten Fraktionen und der ungesorteten Fraktion gegeben und alles durchgemessen. Die Zellpellets wurden bei 96 °C über Nacht getrocknet und in einem Gemisch (50 µL) von Perchlorsäure und Salpetersäure in einem Verhältnis von 3:1 bei 56 °C 3 h lang verdaut. Zur quantitativen Eisen-Messung wurde ein Ferrozin-basierter quantitativer Eisen-Bestimmungs-Kit (Nobiflow Iron) eingesetzt.
20 µL der verdauten Proben und der Leerwert (PBS) wurden in eine 96 Well-Platte transferiert, 200 µL von Reagenz 1 (Nobiflow Eisen-Bestimmungs-Kit) zugegeben und 1-5 min inkubiert. Die Proben wurden dann in einem ELISA-Reader bei 600 nm Wellenlänge gemessen. 40 µL von Reagenz 2 (Nobiflow Eisen-Bestimmungs-Kit) wurden auf die Proben gegeben und 10 min lang inkubiert, bevor erneut in dem Photometer mit den gleichen Einstellungen gemessen wurde. Eine weitere Messung erfolgte am nächsten Tag. Nach 24 stündiger Inkubationszeit der Proben wurden leicht erhöhte Werte gemessen, verglichen mit den Werten nach 2 stündiger Messung. Der Anstieg der Werte beruht auf einer Reaktion der Reagenzien über Nacht.

4.10 Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT)

Zur MRT-Messung an einem 1,5 Tesla MRT-Scanner wurden 1000 unbehandelte HeLa-Zellen und 1000 HeLa-Zellen, die 24 h mit Resovist 1x und PLL 1x inkubiert wurden, in jeweils 20 mL 3%-iger, gasfreier Gelatine in T-25-Zellkulturflaschen gegeben und die Gelatine über Nacht geliert. Das Entgasen der Gelatine erfolgte durch 30-minütige Inkubation der Gelatine in einem Ultraschallbad. Die MRT-Messungen wurden von Bernd Schmitz am Institut für Röntgendiagnostik an der Universität Ulm-Klinikum durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel sind zur Anwendung am Menschen zugelassen und werden in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt. Sie werden in der Krebstherapie zur Zerstörung von Tumoren durch Hyperthermie verwendet. Als Kontrastmittel sind sie in diagnostischen bildgebenden Verfahren wie der MRT nicht mehr wegzudenken.
Die Unterschiede der beiden käuflichen Kontrastmittel Feridex© (vertrieben in Europa unter dem Namen Endorem©) und Resovist® - beides SPIO (kleine Eisenoxidpartikel „small iron oxide particles“ von 10-12 nm)) hinsichtlich der zellulären Aufnahme - sollten untersucht werden, da es von diesen bisher keine vergleichenden Studien gibt. Resovist® besitzt eine carboxylierte Dextranhülle, während bei Feridex© eine Dextranhülle ohne Carboxylgruppen vorliegt. Resovist® besitzt einen Aggregatdurchmesser von 70 nm, Feridex© hingegen erreicht 150 nm Aggregatdurchmesser. Bei den Experimenten zur zellulären Aufnahme wurde das Transfektionsmittel PLL zusätzlich zu den Eisenoxidpartikeln ins Zellkulturmedium gegeben, um eine Erhöhung der Partikelaufnahme in die Zellen zu erreichen. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden eingesetzt, da sie aufgrund ihres hohen Regenerationspotentials klinische Relevanz besitzen und für eine große Anzahl an Anwendungen erforscht werden [206-208]. Da auch Tierstudien mit malignen Zellen geplant sind, wurden HeLa-Zellen als Modellzelllinie ausgewählt und für die Versuche eingesetzt.

5.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen bei MSCs

Die Berliner Blaufärbung wurde mit den Zellkulturen durchgeführt, und die MSCs wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop betrachtet.
Bei den ersten Experimenten, die in 6- oder 12-Well-Platten durchgeführt wurden, betrug die Konzentration der beiden Kontrastmittel Feridex© und Resovist® 25 µg Fe/mL (=1x). Das Transfektionsmittel Poly-L-Lysin (PLL) wurde in einer Konzentration von 1,5 mg/mL in das Zellkulturmedium zugegeben. Die Kontrastmittel sowie das Transfektionsmittel wurden 24 h mit MSCs inkubiert. Unbehandelte MSCs (Abbildung 12 A) sowie MSCs, die nur mit PLL inkubiert wurden (Abbildung 12 B), dienten als Kontrolle. Es wurden die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

MSCs mit Feridex© 1x ohne Transfektionsmittel PLL (Abbildung 12 C), Feridex© 1x mit Transfektionsmittel (E) und Feridex© 10x ohne Transfektionsmittel (G) mit Resovist® 1x ohne Transfektionsmittel PLL (Abbildung 12 D), Resovist® 1x und PLL (Abbildung 12 F) und Resovist® 10x ohne PLL (Abbildung 12 H) miteinander verglichen.
Bei Feridex© war nur eine Aufnahme zu erkennen, wenn vorher PLL zugegeben wurde (vergleiche Feridex© 1x ohne PLL (Abbildung 12 C) mit Feridex© 1x/PLL (Abbildung 12 E)). Es wurden auch blaue Komplexe, die sich intrazellulär zu befinden schienen, nach Zugabe von Resovist® und PLL entdeckt (Abbildung 12 F, Resovist® 1x/PLL). Bei Resovist® ohne Zugabe von PLL (Abbildung 12 D, Resovist® 1x) waren einige kleine blaue intrazelluläre Präzipitate zu erkennen, während diese bei Feridex© ohne PLL (Abbildung 12 C) fehlten.
Verglichen mit den Bedingungen Feridex© 1x und Resovist® 1x ohne PLL wurde mit den Bedingungen Feridex© 10x und Resovist® 10x ohne PLL bei Resovist® (Abbildung 12 H, Resovist® 10x ohne PLL) im Lichtmikroskop eine intrazelluläre Aufnahme, die mit Resovist® 1x/PLL vergleichbar erscheint, entdeckt. Bei Feridex© 10x waren bei den meisten Zellen kaum bläuliche Präzipitate zu erkennen (Abbildung 12 G, Feridex© 10x).
Das gleiche Ergebnis wurde bei HeLa-Zellen (Abbildung 13) erhalten. Bei der Erhöhung der Konzentration an Resovist® auf 250 µg Eisen/mL (10x) war eine kleine Menge bläulicher Präzipitate zu erkennen. Andererseits war der Unterschied für Feridex© zwischen 25 µg Eisen/mL und 250 µg Eisen/mL bei HeLa-Zellen geringer, da hier keine Zunahme bläulicher Präzipitate bei 250 µg Eisen/mL beobachtet werden konnte.
PLL erhöht die intrazelluläre Partikelaufnahme bei beiden Kontrastmitteln Feridex© und Resovist®. Bei einer Erhöhung der Kontrastmittelkonzentration hinsichtlich Resovist® auf das Zehnfache wurde jedoch eine ähnliche Aufnahmerate erreicht wie bei einfacher Konzentration an Resovist® bei PLL-Zugabe.
Es konnte also gezeigt werden, dass bei der Zellmarkierung mit Resovist® auf ein Transfektionsmittel verzichtet werden kann. Resovist® zeigt eine wesentlich stärkere Aufnahme in die Zellen als Feridex©. Eine Erklärung für die höhere Aufnahmerate von Resovist® könnte der Einsatz unterschiedlicher Biopolymere bei der Synthese der Kontrastmittel darstellen. Denn Resovist® besitzt im Gegensatz zu Feridex© eine Dextranhülle aus carboxyliertem Dextran mit einem Durchmesser von 70 nm. Das Carboxydextran befindet sich unter physiologischen Bedingungen zumeist in seiner deprotonierten Form (COO^-). Da Feridex© zwar eine Dextranhülle aber keine geladenen Carboxylgruppen aufweist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die negativ geladenen Carboxylgruppen des Carboxydextrans für die Unterschiede der

Partikelaufnahme in die Zellen verantwortlich sind. Die meisten Transfektionsmittel stellen zwar kationische Transfektionsmittel mit positiver Ladung dar [134, 135, 178], es gibt jedoch auch negativ geladene Substanzen, die als Transfektionsmittel fungieren [209].

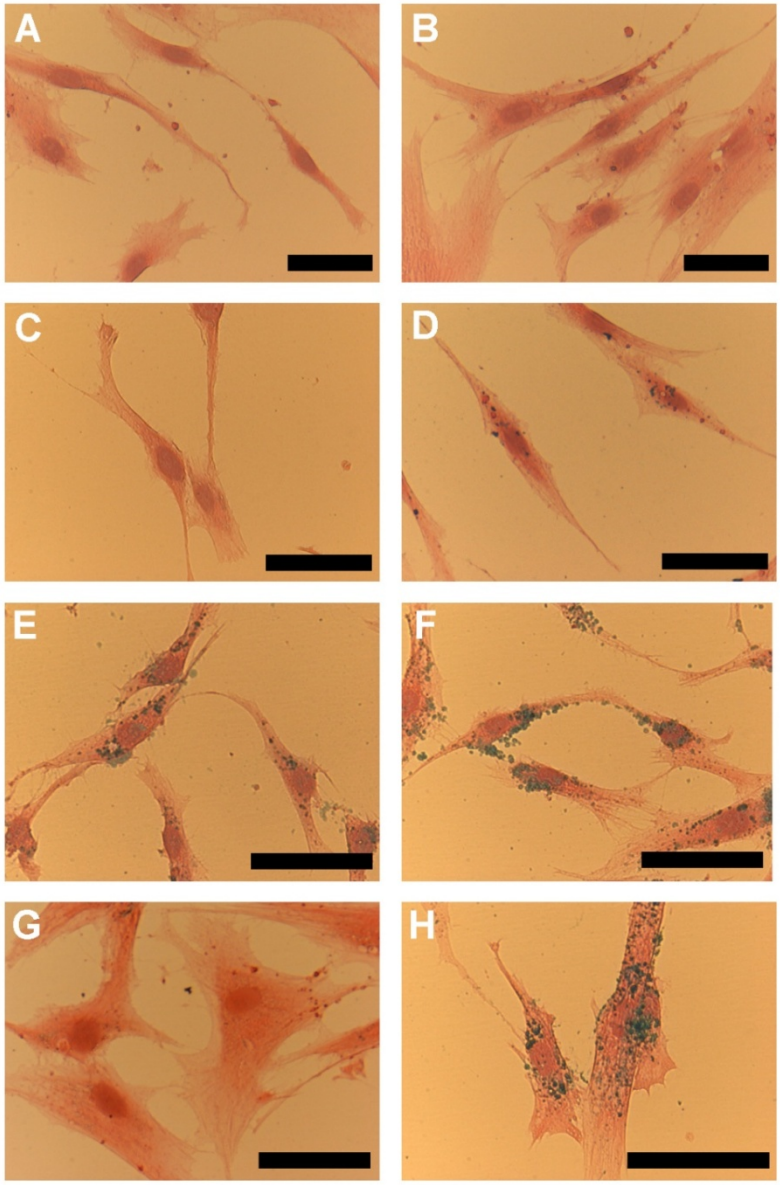


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSCs nach Berliner-Blaufärbung. Bei der Negativkontrolle (A) sowie der Kontrolle, bei der ausschließlich PLL zugegeben wurde, (B) sind keine Eisenaggregate zu finden. Die Zellen wurden 24 h mit dem Kontrastmittel Feridex© und Resovist® inkubiert. Bei Feridex©1x ohne PLL (C) sind in den Zellen keine Eisenaggregate zu finden, bei Resovist® 1x ohne PLL (D) sind in den Zellen jedoch deutlich blaue Aggregate zu finden. Bei Feridex© 1x mit PLL (E) Resovist® mit PLL (F) sind in den Zellen viele blaue Aggregate zu finden. Feridex© 10x (G) zeigt nur wenige blaue Aggregate in den Zellen während bei Resovist® 10x (H) viele Eisenkonglomerate zu finden sind. Maßstab 50 µm.

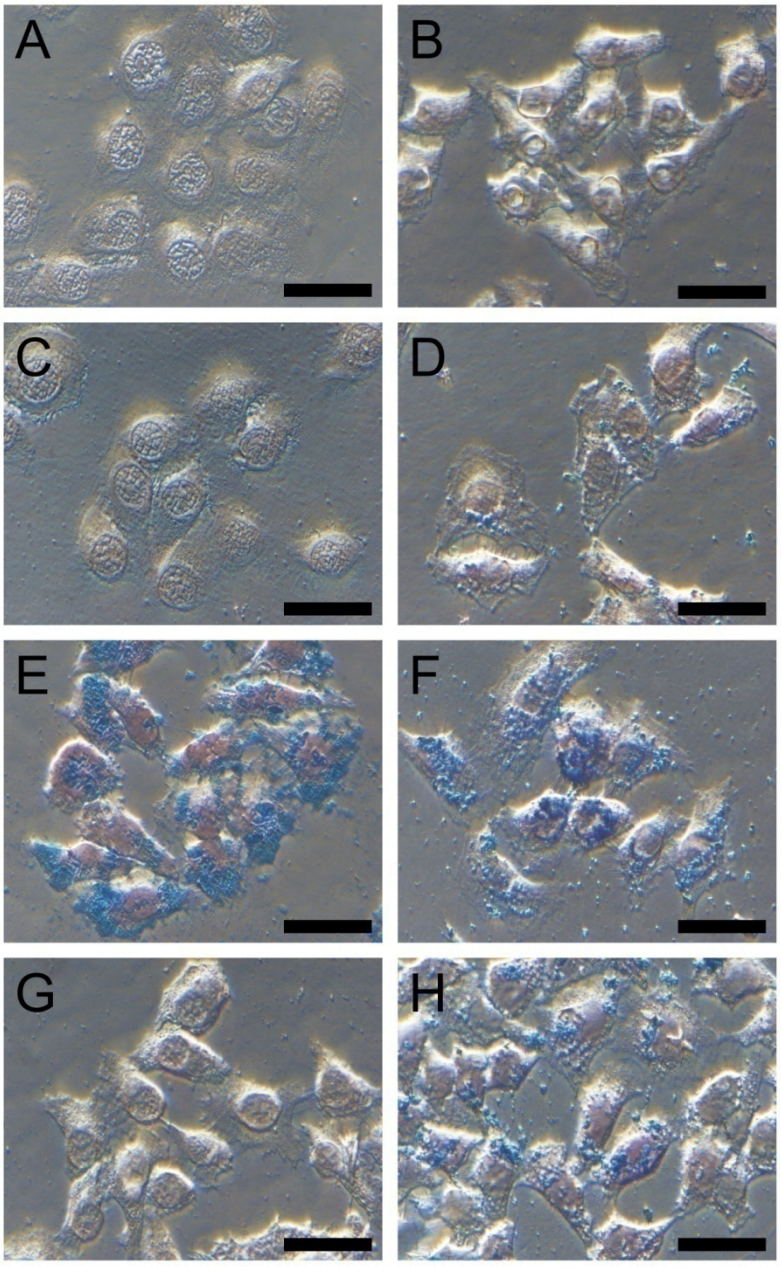


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Berliner-Blaufärbung. Die Zellen wurden mit Feridex© und Resovist® 24 h inkubiert. Die beiden Negativkontrollen (A unbehandelt) und (B nur mit PLL inkubiert) zeigen keine blauen Eisenaggregate. Nach Inkubation mit 1x Feridex© (C) zeigen die Zellen keine blauen Eisenkonglomerationen, während bei 1x Resovist® (D) Einige zu finden sind. Nach Zugabe von 1x PLL sind sowohl bei mit Feridex© 1x (E) als auch mit Resovist® 1x behandelten Zellen (F) viele Eisenaggregate zu erkennen. Bei zehnfacher Konzentration des Kontrastmittels ohne PLL-Zugabe zeigen mit Feridex© behandelte Zellen (G) im Vergleich mit der einfachen Konzentration kaum eine Zunahme an Eisenaggregaten, während mit Resovist® behandelte Zellen (H) eine erhebliche Zunahme an Aggregaten aufweisen; Maßstab 50 µm.

5.1.2 Lokalisation durch das TEM

Mittels Lichtmikroskopie kann nicht eindeutig zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Lokalisation unterschieden werden, und die wenigen bläulichen Präzipitate bei den Experimenten mit Resovist® 1x könnten auch auf extrazellulär lokalisierten Partikeln beruhen.
Um dies auszuschließen, wurden TEM-Studien mit MSCs durchgeführt. Das Transfektionsmittel Poly-L-Lysin (PLL) wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/µL in das Zellkulturmedium zugegeben. Die unbehandelte Negativkontrolle weist keine Partikelaggregate im Zytoplasma auf (Abbildung 14 A). Bei Feridex© 1x (Abbildung 14 B) sowie Feridex© 10x (Abbildung 14 F) waren kaum intrazelluläre Nanopartikel vorhanden, was die Ergebnisse der Lichtmikroskopie bestätigt. Bei Feridex© 1x mit PLL wurden sowohl extrazelluläre Anlagerungen als auch elektronendichtes intrazelluläres Material gefunden (Abbildung 14 D, weiße Pfeile). Diese Anreicherung von elektronendichtem Material unterschied sich strukturell von dem in unbehandelten Kontrollen (Abbildung 14 A, dunkler Bereich mit schwarzem Pfeil). Ähnliche Ergebnisse wurden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von 1x Resovist®/PLL (Abbildung 14 E) gefunden. Bei Resovist® 1x beobachteten wir einige intrazelluläre Einlagerungen von Nanopartikeln (Abbildung 14 C), während sich bei Resovist® 10x viele Partikelcluster intrazellulär befanden (Abbildung 14 G). Die TEM-Analyse bestätigt das Ergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung und verdeutlicht, dass bei Resovist® auf ein Transfektionsmittel verzichtet werden kann, wenn die Kontrastmittelkonzentration um das Zehnfache erhöht wird. Auch bei der TEM-Analyse zeigt Feridex© eine erheblich schlechtere Markierungseffizienz der Zellen als Resovist®. Die Nanopartikel befanden sich in Clustern in intrazellulären Kompartimenten, die Endosomen ähneln (Abbildung 14 B, D, E und G). Im Zellkern und den Mitochondrien wurden keine Partikel gefunden. Es waren auch keine Partikel im Zytoplasma zu erkennen.

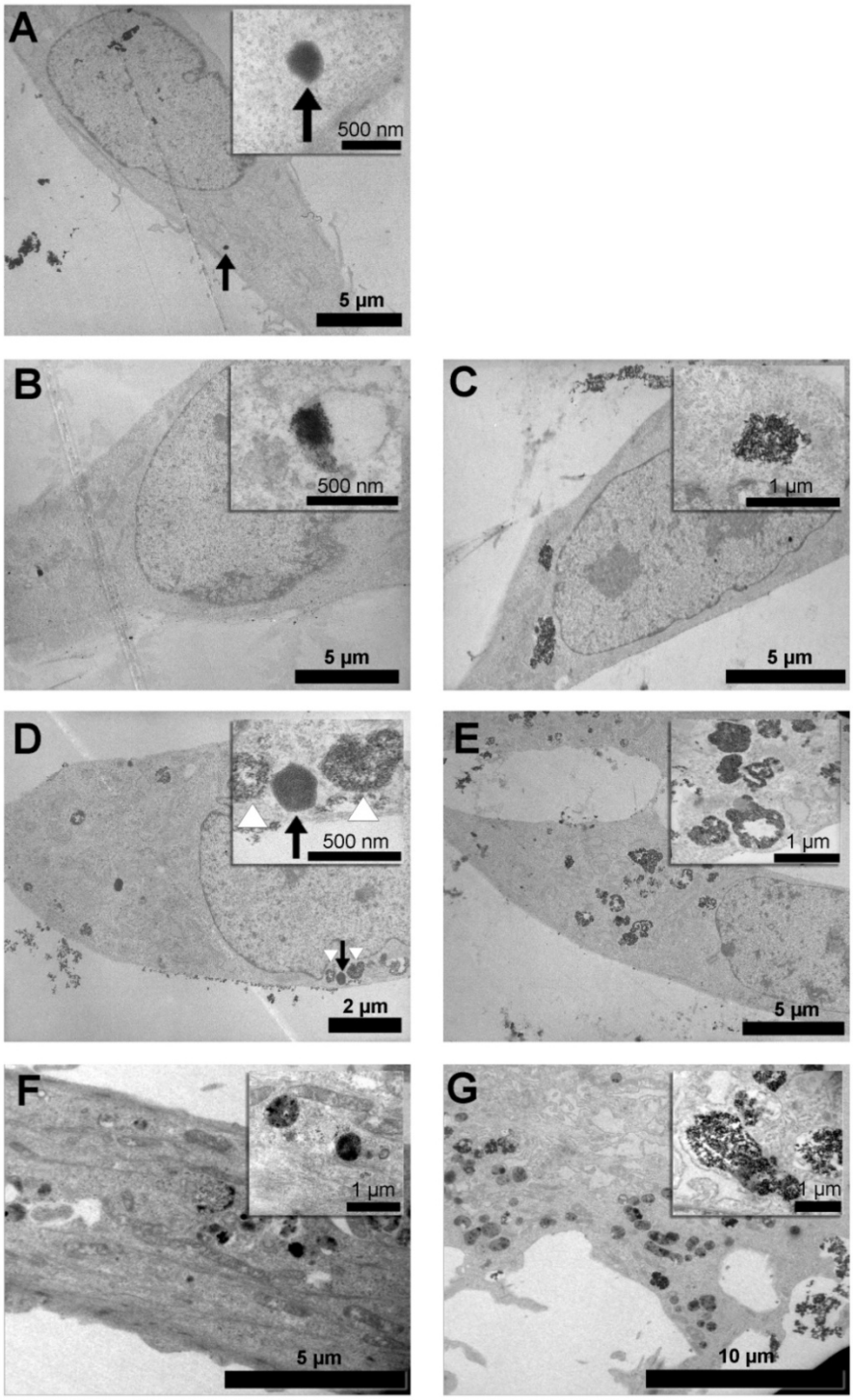


Abbildung 14: TEM-Analyse von MSCs, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Resovist® und Feridex© mit und ohne PLL 24 h inkubiert wurden. Die Negativkontrolle zeigt dunkle Strukturen im Zytoplasma (A), die aber auch in markierten Zellen (D) vorkommen und von den intrazellulären Eisenoxidpartikeln abgegrenzt werden können. Zellen, die mit Feridex© (B) und Resovist® (C) 1x ohne PLL behandelt wurden, weisen kaum intrazellulär lokalisierte Partikel auf. Nach Inkubation von Feridex© 1x und PLL 1x (D) und Resovist® 1x und PLL 1x (E), sowie Feridex© 10x (F) und Resovist® 10x (G) sind viele intrazelluläre Partikelanreicherungen zu finden.

5.1.3 Quantitative Eisenmessung

Die Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel in HeLa-Zellen und MSC wurde nun quantifiziert. Da aufgrund des niedrigen Eisengehaltes in den Zellpopulationen 500.000 bis eine 1.000.000 Zellen für die Detektion benötigt wurden, wurden zunächst HeLa-Zellen in der ersten Versuchsreihe eingesetzt. Um den Eisengehalt zu messen, wurde der Ferrozin-Test eingesetzt. Messungen des Eisengehalts wurden nach intensivem Waschen durchgeführt, um die nicht aufgenommenen Nanopartikel zu entfernen. Es war kein messbarer Unterschied bei den Proben ohne Eisenoxidpartikel (Negativkontrolle und PLL, Abbildung 17 A und B) und den Proben, in denen nur Feridex© und Resovist® 1x mit den Zellen inkubiert wurden, zu erkennen. Bei Zugabe von PLL zu Feridex© oder Resovist® konnte ein messbarer Eisengehalt in diesen Ansätzen detektiert werden (Abbildung 17 A, Feridex© 1x/PLL 1x, Resovist® 1x/PLL 1x). Bei Feridex© wurden ungefähr 17 pg Fe/Zelle und bei Resovist® 11 pg Fe/Zelle gemessen. Ähnliche Werte werden auch in der Literatur beschrieben und bestätigen das Ergebnis. So wurden Eisengehalte pro Zelle von 10 bis 25 pg Eisen/Zelle hinsichtlich Feridex© in HeLa-Zellen und MSCs [210] gemessen. Aufgrund der Beobachtung einiger bläulicher Präzipitate in MSCs und HeLa-Zellen bei Resovist® 1x wurden diese Zellen mit zunehmender Konzentration von Resovist® von 25 µg Fe/ml bis 500 µg Fe/mL (1x bis 20x) inkubiert. Nach Zugabe von 250 µg Fe/mL (10x) wurde 14 pg Fe/Zelle in HeLa-Zellen gefunden (Abbildung 17 B). Feridex© wurde weniger gut in die Zellen aufgenommen. Es wurde nur 3.3 pg Fe/Zelle in HeLa-Zellen bei den gleichen Bedingungen gemessen (10x = 250 µg Fe/mL). Das Ergebnis bestätigt die Berliner-Blaufärbung und die TEM-Analyse, wobei eine wesentlich geringere Partikelaufnahme bei Feridex© im Gegensatz zu Resovist® beobachtet wurde.

Bei MSCs wurden hinsichtlich der Inkubation der SPIOs mit oder ohne Transfektionsmittel PLL ähnliche Ergebnisse gefunden (siehe Abbildung 17 C). Eine Erhöhung des Gehalts an SPIOs bei der Inkubation resultierte in recht guten Eisengehalten pro Zelle (Abbildung 17 D). Sie übersteigen mit 120 pg Fe/Zelle für 10x Resovist® sogar die Werte, die bei MSCs bei Zugabe von Resovist bei einer Konzentration von 25 µg Eisen pro mL und Zugabe von Transfektionsmittel erhalten wurden. Bei einer Erhöhung der SPIO-Konzentration im Medium war ein starker Anstieg des pro Zelle berechneten Eisens zu erkennen. Sehr hohe Gehalte an Nanopartikeln in der Zelle wurden zwar von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [144, 162, 178, 211], hinsichtlich zellbiologischer Gesichtspunkte erscheint es aber wahrscheinlich, dass das intrazelluläre Speichervolumen oder der Aufnahmemechanismus den limitierenden Faktor darstellen und zu einer

Abflachung/Sättigung der Kurve bei höheren Konzentrationen an SPIOs führen müsste. Dies wurde auch schon für andere Substanzen gezeigt [212]. Daher wurden diese Inkubationsbedingungen (250 µg Eisen pro mL Medium Feridex© oder Resovist®) lichtmikroskopisch und mittels TEM in MSCs untersucht. Dabei wurde stark koaguliertes Material in Bereichen der Zellmembran gefunden, an denen nicht stark gewaschen wurde (Abbildung 15 A und B). Auch nach PLL- und SPIOs-Zugabe wurden koagulierte Präzipitationen außen an der Zellmembran gefunden (Abbildung 15 C und D). Diese extrazellulären Partikelkoagulationen machen einen signifikanten Anteil bei der quantitativen Eisenbestimmung aus.

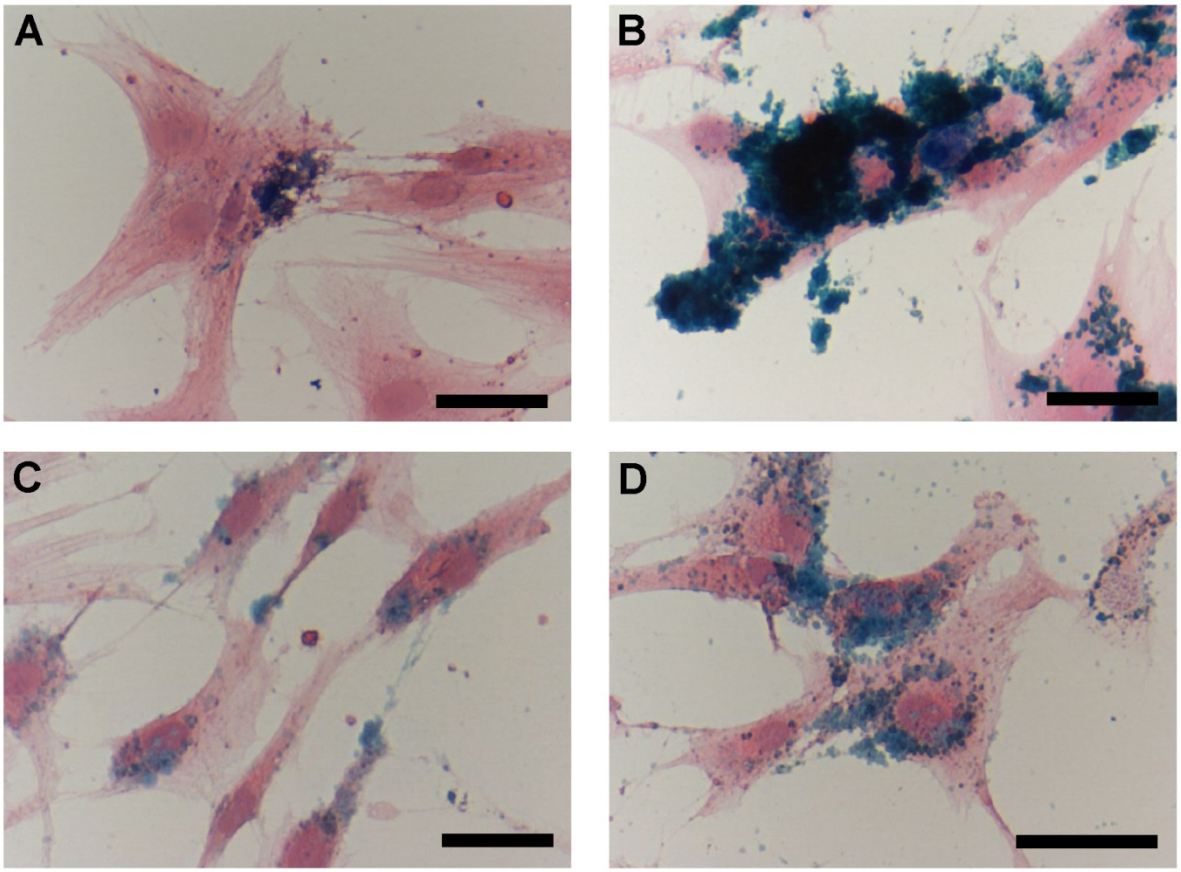


Abbildung 15: Berliner-Blaufärbung von MSCs nach 24 h Inkubation von Feridex© 10x (A) und Resovist® 10x (B) und Feridex© 1x mit PLL 1x (C) und Resovist® 1x mit PLL1x (D). Es befinden sich viele Eisenaggregate extrazellulär an die Zellmembran angelagert; Maßstab: 50µm

Das FACS kann dazu verwendet werden, Zellen und Partikel aufgrund des Größenunterschieds (Vorwärtsstreuung, FSC) und ihrer Granularität (Seitwärtsstreuung, SSC) voneinander zu unterscheiden (Abbildung 16). MSCs wurden 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen an Resovist® (1x, 5x 10x und

20x) inkubiert. Die FACS-Messungen zeigen eine Korrelation zwischen der Anzahl der Ereignisse, die als Maß für die Partikelkoagulation gesehen werden kann, im Partikelgate R2 und der Konzentration des Kontrastmittels, das ins Medium zugegeben wurde. Die Partikelkoagulation hängt also von der Partikelkonzentration im Zellmedium ab. Je höher die Partikelkonzentration war, desto stärker fiel die Partikelkoagulation aus (Abbildung 16 und Tabelle 1). Bei Resovist® 1x wurden im Partikel-Gate nur wenige Ereignisse, die Partikel darstellen, gemessen, während die Anzahl der Ereignisse von Resovist® 5x und Resovist® 10x nach Resovist® 20x ansteigt. Durch die auftretende Partikelkoagulation wurde die Quantifizierung des intrazellulären Eisengehaltes erschwert, da die extrazellulären Partikelanlagerungen vermutlich nicht vollständig durch Waschen entfernt werden konnten und bei der Eisenbestimmung mitgemessen wurden.

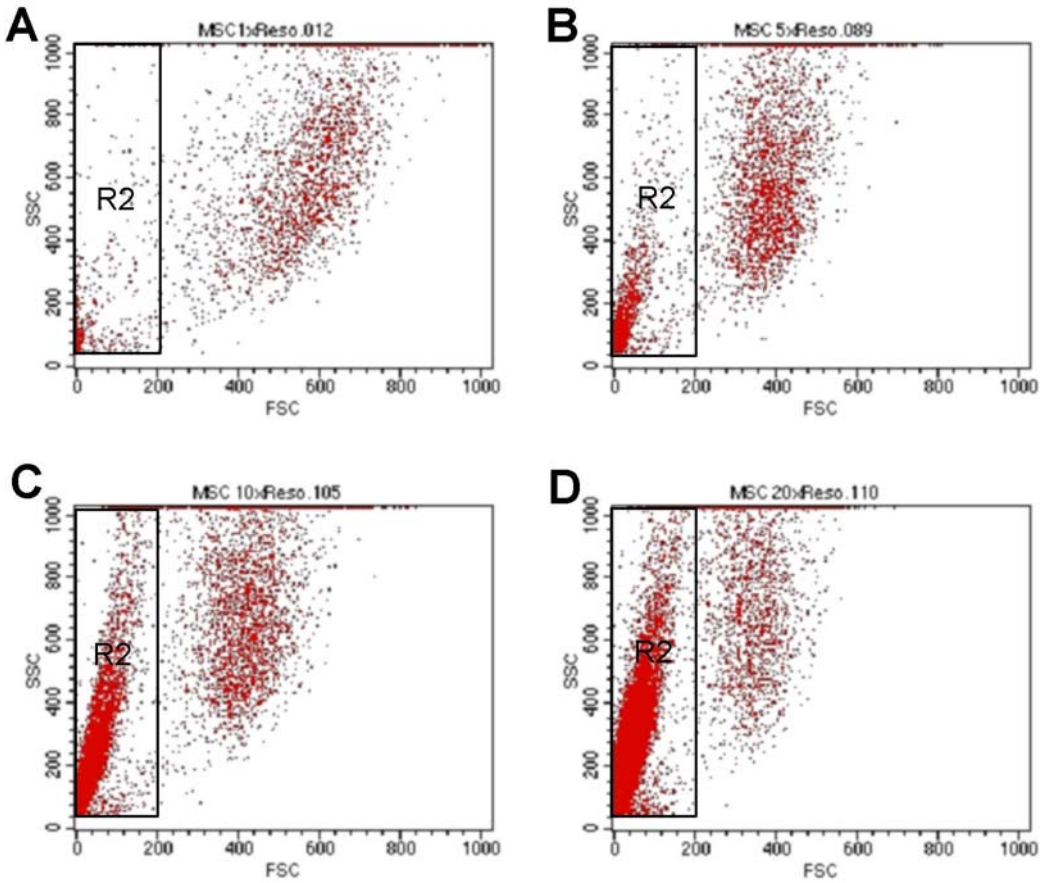


Abbildung 16: FACS Analyse von MSCs, die 24 h über Nacht mit Resovist inkubiert wurden. Bei Resovist® 1x waren im Partikel-Gate (R2) nur wenige Ereignisse zu finden (A). Die Partikelanzahl stieg jedoch von Resovist® 5x (B) und Resovist® 10x (C) bis Resovist® 20x (D) an.

Tabelle 1: Partikelkoagulation: Die Partikelkoagulation wird als Anzahl der Ereignisse im Partikelgate R2 angegeben.

	Resovist® 1x	Resovist® 5x	Resovist® 10x	Resovist® 20x
R2 Partikelgate	5359	8297	22059	151643

Um den tatsächlichen Eisengehalt innerhalb der lebenden Zelle zu quantifizieren, war es zunächst nötig, die koagulierten Nanopartikel von den Zellen zu trennen. Dabei wurden die beiden Populationen (Zellen und koagulierte Partikel) in einem Hochgeschwindigkeitszellsorter getrennt. HeLa-Zellen wurden aufgrund der starken Expression des CD55-Rezeptors, MSCs aufgrund der CD44-Expression getrennt. Tote Zellen wurden mittels 7-AAD-Färbung analysiert, was eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen im gleichen Versuchsansatz ermöglichte, während die koagulierten Partikel die Restfraktion darstellen. Die Restfraktion setzt sich aus toten Zellen, Partikeln und CD55 oder CD44 negativen Ereignissen zusammen. Bei Erhöhung der Konzentration der superparamagnetischen Partikel im Medium ist ein erheblicher Anstieg im SSC sowie ein mäßiger Abfall in der FSC-Skala in der Zellpopulation zu erkennen, d.h. die Zellen sind granulärer. Die Aufnahme der Nanopartikel in sterbende oder tote Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht fokussiert. Lebende Zellen wurden als CD55 positiv/7-AAD negative/ hoher FSC und CD44 positiv/7-AAD negativ/ hoher FSC gesortet. Nach der Bestimmung der Zellzahl der gesorteten Populationen mit einer kalibrierten Anzahl fluoreszierender Mikropartikel (TruCount-Beads) und dem Trocknen der Zellpellets wurde der Eisengehalt dieser beiden Populationen quantifiziert. In der Sort-Fraktion (Presort) ist eine höhere Menge an Eisen pro Zelle enthalten, während gesortete Zellen beträchtlich weniger Eisen pro Zelle aufwiesen. Dieser Effekt ist weniger ausgeprägt bei der Inkubation der SPIOs mit PLL (siehe Abbildung 18) als bei höheren Konzentrationen an SPIOs. Resovist® zeigt dabei einen höheren Eisengehalt in der Presortfraktion versus Zellfraktion als Feridex© (Abbildung 18). Beim Vergleich von gesorteten MSC mit gesorteten HeLas zeigten sich höhere Konzentrationen an Resovist® (Resovist® 10x) bei der Markierung beider Zelllinien als sehr effektiv. Dagegen war Feridex© bedeutsam weniger effektiv bei der Markierung von HeLa-Zellen (siehe Abbildung 18 A, Feridex© 10x), während bei MSCs bei Feridex© 10x

eine detektierbare Aufnahme zeigte (siehe Abbildung 18 B).
Werden derartige Partikelaggregate zusammen mit den markierten Zellen in den Blutkreislauf gebracht, können sie nicht mehr von den markierten Zellen unterschieden werden. Bei der MRT-Analyse können Makrophagen, die Partikelaggregate aufgenommen haben, dann nicht von den migrierenden Zielzellen unterschieden werden. Daher sollten die extrazellulären Aggregate bei der Bestimmung des Eisengehalts pro Zelle und vor der Applikation *in-vivo* entfernt werden. Eine gut etablierte Methode stellt das Sorten mit dem FACS zur Aufreinigung einer Zellpopulation mittels fluoreszierenden Markers und des FSC/SSC dar [213]. Zusammenfassend ist Resovist® in einer hohen Konzentration ohne Einsatz eines Transfektionsmittels eine geeignete Substanz zur Markierung beider Zelllinien, während Feridex© zur Markierung von MSCs weniger geeignet ist. Die unterschiedliche Transfektionseffizienz und Koagulationstendenz der Partikel scheint, wie bereits erwähnt auf den Eigenschaften der Dextranhüllen bei Feridex© und Resovist® zu beruhen.

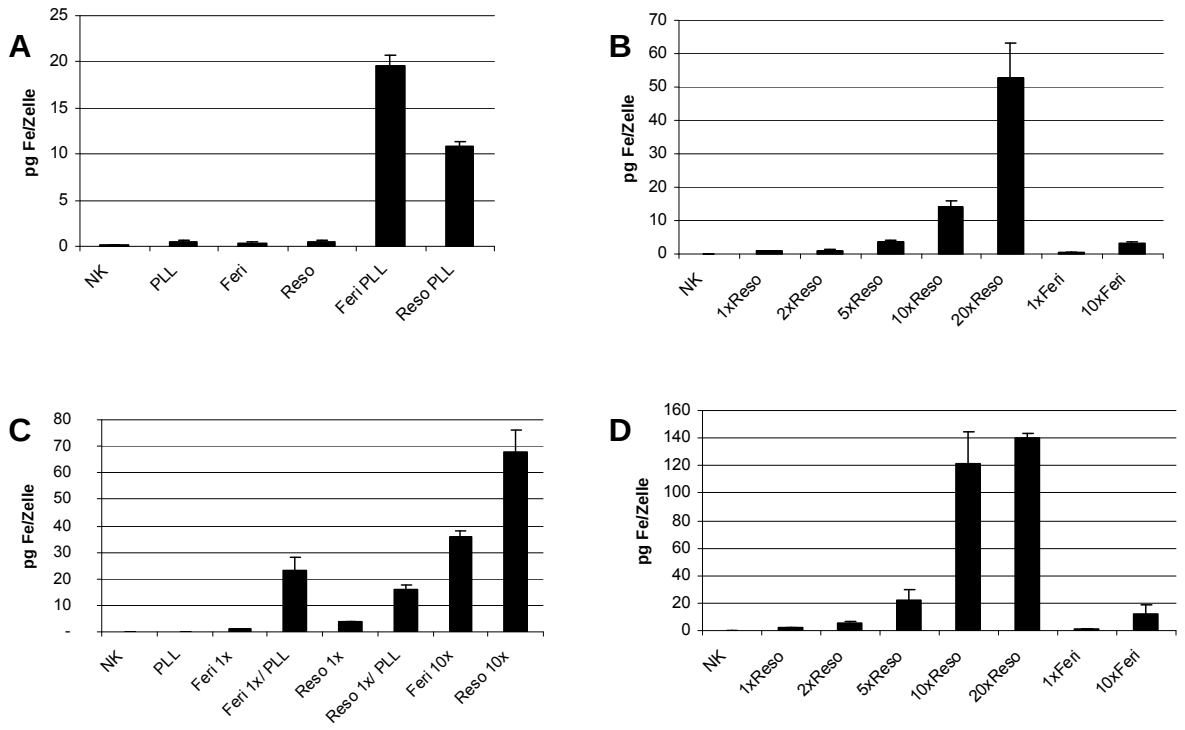


Abbildung 17**:** Quantitative Eisenbestimmung mittels Ferrozin-Test von HeLa (A und B) und MSCs (C und D) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Resovist und Feridex mit und ohne PLL-Zugabe.

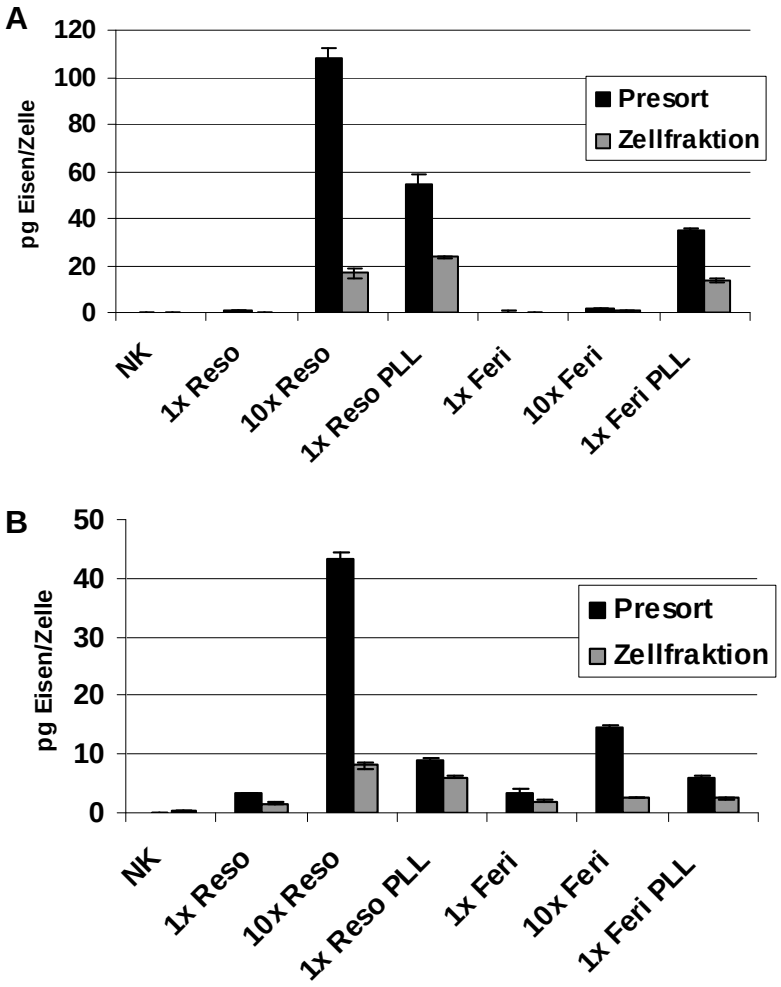


Abbildung 18**:** Trennung der Zellen von den koagulierten Partikeln mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeitszellsorters nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit Resovist® und Feridex© 1x mit und ohne PLL sowie Resovist® 10x. Hela-Zellen (A) und MSCs (B).

5.1.4 Toxizität hoher Konzentrationen an SPIOs

Da SPIOs in recht hohen Konzentrationen verwendet wurden, wurde deren Zytotoxizität evaluiert, indem 7-AAD als Marker für prä-apoptotische und apoptotische Zellen eingesetzt wurde. Wie in Abbildung 19 gezeigt, war ein Toxizitätseffekt weder bei der Verwendung von 250 µg Fe/mL (=10x) Feridex© noch bei Resovist® in der gleichen Konzentration zu erkennen. Der Anteil an 7-AAD-positiven Zellen in Dreifachansätzen unterschied sich für alle Bedingungen statistisch nicht von der Negativkontrolle. Auch bei PLL-Zugabe in einer Konzentration von 1,5 µg/mL Kulturmedium konnte keine erhöhte Zytotoxizität festgestellt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass PLL in einer Konzentration von 0,75 µg/mL im Medium keine Zytotoxizität aufweist [179] und erst ab einer Toleranzgrenze von 10 µg/mL Medium zytotoxisch wirkt [135, 214]. Damit liegt die in dieser Arbeit

eingesetzte PLL-Konzentration unter der zytotoxischen Konzentration.

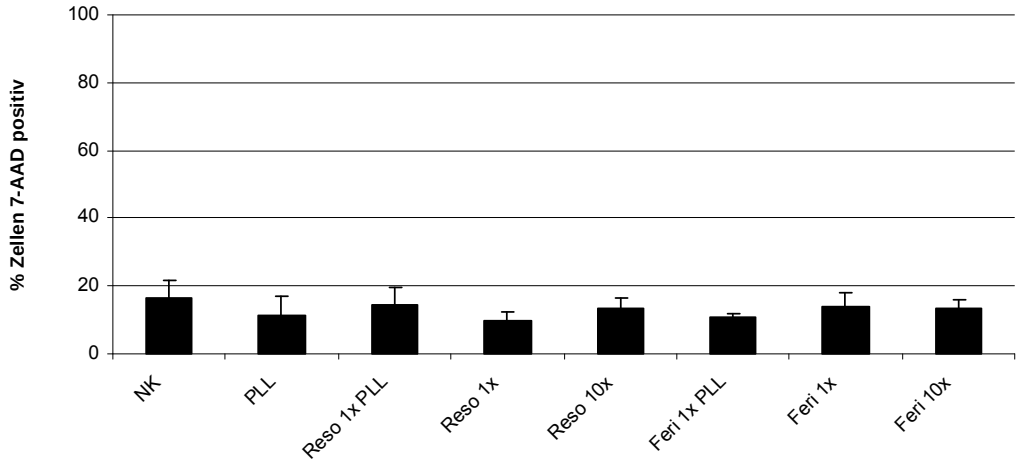


Abbildung 19**:** Vitalitätstest mit MSCs mit Hilfe von 7-AAD nach 24 stündiger Inkubation mit den Kontrastmitteln Resovist® und Feridex© in verschiedenen Konzentrationen mit oder ohne PLL-Zugabe.

5.1.5 MRT

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Körperschichten. Diese Schnittbilder ermöglichen den Einblick in innere Organstrukturen und erlauben eine Beurteilung der Organe und Organveränderungen. MRT erzeugt auch ohne den Einsatz eines Kontrastmittels einen relativ guten Weichteilkontrast. Bei vielen Anwendungen ist jedoch eine Erhöhung des Kontrastes erforderlich, um genauere Aussagen über die Funktion bestimmter Gewebeabschnitte zu erlauben. Dazu werden zum Beispiel superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel eingesetzt, welche kommerziell verfügbar und für klinische Anwendungen zugelassen sind [158, 159].
Mittels MRT könnte auch die Migration und das Homing von Zellpopulationen in lebenden Organismen untersucht werden. So könnten markierte Stammzellen, die geschädigtes oder zerstörtes Gewebe ersetzen können, nach Transplantation oder Injektion *in vivo* verfolgt werden [158]. Um markierte Zellpopulationen in lebenden Organismen mittels MRT verfolgen zu können, muss zunächst die Nachweisgrenze für das Kontrastmittel, sowie die Anzahl der detektierbaren Zellen ermittelt werden.
Es sollte zunächst untersucht werden, ob einzelne markierte Zellen in einer Gewebsprobe mittels MRT detektiert werden können. Dazu wurden die Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln markiert. Als Ersatz für ein biologisches System (z.B. Maus) wurde zunächst Gelatine aufgrund ihrer gewebeähnlichen biologischen Eigenschaften (ähnlicher Wassergehalt, Viskosität) ausgewählt.
1000 HeLa-Zellen wurden nach 24 h Inkubation mit dem Kontrastmittel Resovist® 1x und PLL 1x in 3%-ige Gelatinelösung gegeben und durch vorsichtiges Mischen homogen verteilt. Da Lufteinschlüsse in den Gelatineproben zu Artefakten bei der MRT-Analyse führen, wurde die 3%-ige Gelatinelösung vor dem Gelieren 15 min mit Ultraschall behandelt und dann über Nacht geliert.
Die MRT-Analyse der Gelatineproben mit 1000 HeLa-Zellen, die mit Resovist® 1x und 1x PLL markiert wurden, ergab einzelne Signalabschwächungen in der Gelatine, die auf einzelne Zellen oder Zellgruppen hinweisen (Abbildung 20, schwarze Pfeile). Bei der Negativkontrolle fehlten diese. Es traten keine Artefakte auf, die auf Verunreinigungen oder Lufteinschlüsse in der Gelatine hinweisen könnten. Es kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden, ob es sich bei den Signalabschwächungen um einzelne Zellen oder Zellaggregate handelt. Da die Zellen jedoch vor der Zugabe in die Gelatinelösung gut vereinzelt wurden, dürfte es sich bei Aggregaten lediglich um wenige Zellen handeln. Dieses Ergebnis zeigt, dass einzelne Zellen oder Zellaggregate aus nur wenigen Zellen mittels MRT in einer Gelatineprobe detektiert werden können. Ob das gleiche Ergebnis auch in lebenden

Systemen beobachtet werden kann, kann nicht mit Sicherheit angenommen werden, da hier auch noch andere Einflüsse die Messung beeinträchtigen können.
Aufgrund dieses Ergebnisses wurden Versuchsreihen gestartet, bei denen MSCs mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln markiert und im Gehirn von Mäusen mittels MRT im Weiteren detektiert werden sollen.

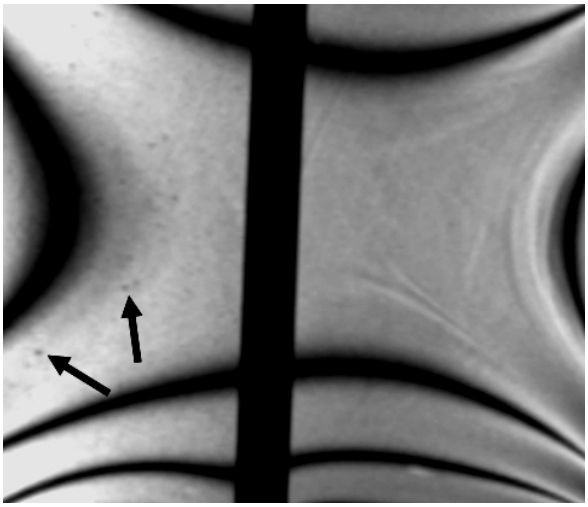


Abbildung 20: MRT von 1000 HeLa-Zellen, die mit Resovist® 1x und PLL 1x über Nacht inkubiert wurden, in 25 ml gasfreier Gelatine. Es sind einzelne Zellen im MRT (linke Seite; Pfeil) zu erkennen. Die rechte Seite zeigt die Negativkontrolle.

5.2 Partikel mit COOH-Gruppen auf der Oberfläche

Aufgrund der Annahme, dass die negativ geladenen Carboxylgruppen des Carboxyldextrans für die beobachteten Unterschiede zwischen Resovist® und Feridex© verantwortlich sind, wurden Partikel mit unterschiedlicher Dichte an Carboxylgruppen auf der Oberfläche (Tabelle 2) [215] synthetisiert. Die Nanopartikel wurden mittels Miniemulsionsprozess synthetisiert, wobei der fluoreszierende Farbstoff PMI (Perylenmonoimid Abbildung 11), der als Reporter diente, mit in die Partikel eingeschlossen wurde. Als Polymer wurde Polystyrol ausgewählt, da es preiswert, stabil, gut bekannt ist und leicht durch Kopolymerisation funktionalisiert werden kann [216].
Die Oberflächenladung wurde durch die Einstellung der Menge an co-polymerisiertem Monomer Acrylsäure (AA=acrylic acid) variiert. Das bedeutet, dass die Menge an eingesetzter Acrylsäure mit der Oberflächenladung (Gehalt an Carboxylgruppen) korreliert (siehe Tabelle 2). Der Partikel P1 dient als Kontrollpartikel, da er keine Oberflächenladung aufweist. Die Partikel VHPM1-10 (1-

10% Acrylsäure) besitzen einen Durchmesser von ungefähr 100 nm, während die Partikel VHPM15 und VHPM20 einen Durchmesser von ca. 150 nm aufweisen. P1 ist mit einem Durchmesser von 168 nm mit Partikel VHPM15 (15% Acrylsäure) und VHPM20 (20% Acrylsäure) zu vergleichen.
Die Aufnahme der Partikel sollte in MSCs, die aufgrund ihres hohen Differenzierungspotentials besonders in der regenerativen Medizin von Bedeutung sind und HeLa-Zellen, die als Modell für maligne Zellen dienten, untersucht werden. Die Aufnahme der Partikel wurde auch in Suspensionszelllinien wie Jurkat-Zellen, die als Modell für T-Zellen und KG1a-Zellen, die als Modell für CD34 positive hämatopoetische Stammzellen ausgewählt wurden, getestet. Dabei wurde aufgrund der Hypothese, dass die Oberflächenladung die Partikelaufnahme in die Zellen beeinflusst und der guten Ergebnisse für Partikel mit Carboxylgruppen auf der Oberfläche (Resovist®), auf den Einsatz eines Transfektionsmittels verzichtet.

Tabelle 2: Fluoreszierende Polymernanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an Carboxylgruppen auf der Oberfläche. Durch Erhöhung der bei der Synthese eingesetzten Acrylsäure entstehen Partikel mit einem zunehmenden Gehalt an Carboxylgruppen auf der Oberfläche.

Probenname	Menge an eingewogener Acrylsäure [wt%]	COO^--Gruppen pro Partikel	COO^--Gruppen pro nm^2	Partikelgröße [nm]
P1		-	-	168
vhpm2	2	9 266	0,31	98
vhpm3	3	12 275	0,39	100
vhpm5	5	11 847	0,40	97
vhpm10	10	21 733	0,66	103
vhpm15	15	150 844	2,19	148
vhpm20	20	317 821	4,48	150

5.2.1 FACS

Die meisten in der Literatur beschriebenen Untersuchungen vergleichen die Eigenschaften verschiedener Polymerpräparationen durch eine quantitative Messung des Reporters [138, 217, 218]. In dieser Arbeit wurde die relative Menge an

Adhärenz oder intrazellulärer Aufnahme der Polymerpartikel mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs und FACS-Messungen bestimmt.
HeLa-Zellen und MSCs wurden mit den oberflächenfunktionalisierten Partikeln über Nacht (18-24 h) ohne Einsatz eines Transfektionsmittels inkubiert. Da die Partikel zwar ähnliche, aber nicht identische Mengen des Fluoreszenzmarkers PMI enthielten, wurde die Fluoreszenzintensität auf die Anzahl an PMI-Molekülen in der Probe ohne Oberflächenladung normalisiert. Nach der Normalisierung der unterschiedlichen Konzentrationen des fluoreszierenden Reporters PMI zeigten die Partikel mit Carboxylgruppen (siehe Abbildung 21 A) in MSCs eine zunehmende Aufnahme mit ansteigendem Gehalt an Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche verglichen mit Partikeln ohne Carboxylgruppen (P1). Die Partikelaufnahme war für VHPM-5 (5% AA) mit ungefähr 12.000 Carboxylgruppen bzw. einer Dichte von 11.847 COO^-/Partikel (0,4 COO^-/nm^2) am besten. Die höchste Dichte an Carboxylgruppen wiesen die Partikel VHPM-10, VHPM-15 und VHPM-20 auf, was sich bei MSCs in einer geringeren Aufnahme zeigte. Auch HeLa-Zellen zeigten eine Korrelation der gemessenen Fluoreszenzintensität mit ansteigendem Gehalt an Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche (Abbildung 21 B; VHPM-1 bis VHPM-20). Auch hier nahm die Fluoreszenzintensität bei Partikeln mit sehr hohem Gehalt an Acrylsäure (VHPM-15 und VHPM-20) ab. Die gemessene Fluoreszenzintensität erreichte ebenso ihr Maximum bei Partikel VHPM-5 (5% AA). Es gab jedoch auch Unterschiede zwischen HeLa-Zellen und MSCs. Die beste Aufnahmerate für VHPM-5 bei MSCs war etwa 2,7-mal höher war als in HeLa-Zellen. Sogar VHPM-1 mit ungefähr 5.864 COO^-/Partikel (0,19 COO^-/nm^2) wurde von MSCs leicht aufgenommen (11,3 mal höhere Fluoreszenzintensität als bei P1), wobei der Unterschied zwischen dem Partikel mit der höchsten Aufnahme (VHPM-5) und dem Partikel mit der niedrigsten Dichte an Carboxylgruppen (VHPM-1) weniger deutlich hervortritt als bei HeLa-Zellen. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einer Acrylsäuremenge im Polymer von 5% deutet auf eine zunehmende Partikelaufnahme in die Zellen hin. Ein Grund für die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei höheren Acrylsäuremengen könnte die Tendenz der Carboxylgruppen, haarige Schichtformationen auf der Partikeloberfläche zu bilden, bedingen. Höhere Acrylsäuremengen als 10% AA führten zu einer Partikelfraktion mit größerem Durchmesser (150 nm versus 100 nm), was durch ein Anschwellen der Partikel durch die haarige Schichtformation bedingt ist. Dies könnte durchaus zu einer erschwerten Partikelaufnahme in die Zellen führen, da der Unterschied der Partikelgröße zwischen den Partikeln mit mehr als 10% AA und den Partikeln mit weniger als 10% AA immerhin 50 nm beträgt.
Bei den beiden Zelllinien Jurkat und KG1a, die auch getestet wurden, war keine

eindeutige Korrelation zwischen der Dichte der Carboxylgruppen und der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Einige dieser Partikel zeigten sogar eine relative Fluoreszenzintensität im Bereich des nicht modifizierten Partikels P1 (Abbildung 21 C und D). Die Unterschiede der Partikelaufnahme zwischen Adhäsionszelllinien wie MSCs und HeLa-Zellen und Suspensionszelllinien wie Jurkat- und KG1a-Zellen könnten auf unterschiedlichem Endozytose/Pinozytoseverhalten beruhen.

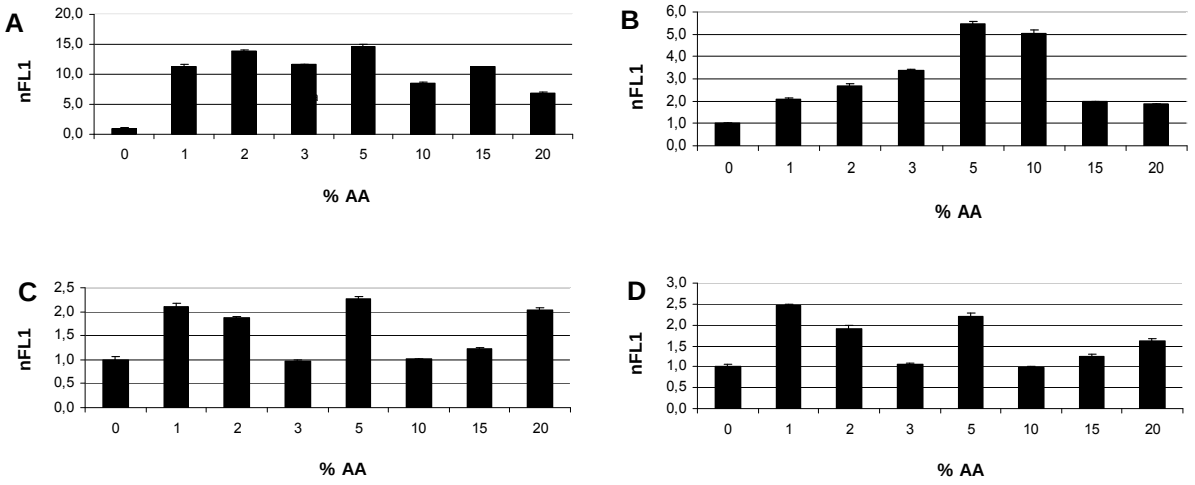


Abbildung 21**:** FACS-Messungen der relativen Fluoreszenzintensität nach 24 stündiger Inkubation von MSC (A), HeLa (B), Jurkat (C) und KG1a (D) mit den Polymerpartikeln VHPM1-20, die nach steigendem AA (Acrylsäuregehalt) aufgetragen wurden.

5.2.2 CLSM

Da mittels FACS-Analyse nicht zwischen intrazellulär lokalisierten oder extrazellulär an die Zellmembran angelagerten Nanopartikeln unterschieden werden kann, wurden markierte Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) betrachtet. MSCs, Jurkat- und KG1a-Zellen wurden 24 h mit den Partikeln VHPM2-20 inkubiert. Es werden nur die Ergebnisse der Partikel VHPM5 und VHPM20 gezeigt, da die anderen Bilder der Serie keine Unterschiede aufweisen und somit keine Aussage erlauben. Mittels LSM ist es also nicht möglich, kleinere Unterschiede in der Partikelaufnahme der Zellen zu unterscheiden.
Die CLSM-Analyse zeigt die grün fluoreszierenden Partikel VHPM5 und VHPM20 in MSCs (Abbildung 22) und Jurkat (Abbildung 23) und KG1a (Abbildung 24). Die Lipide der Zellmembran sind mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff RH414 angefärbt, um die Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulär lokalisierten

Partikeln zu erleichtern. Bei der Negativkontrolle (Abbildung 22 A, Abbildung 23 A und Abbildung 24 A) sind keine grünen Fluoreszenzsignale zu erkennen. Der Partikel VHPM5 (Abbildung 22 B) zeigt bei MSCs eine stärkere Grünfluoreszenz im Zytoplasma als VHPM20 (Abbildung 22 C). Dies stimmt mit den FACS-Ergebnissen überein. Eine mögliche Erklärung für die schwächere Aufnahme des Partikels VHPM20 könnte die sehr hohe Dichte an Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche darstellen. Bei MSCs sind die meisten Partikel im Zytoplasma zu finden, während bei Jurkat-Zellen insbesondere bei Partikel VHPM-20 sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisierte Partikel zu finden sind (Abbildung 23 C). Extrazelluläre Partikelanlagerungen an die Zellmembran erscheinen aufgrund des Overlays des roten (RH414) und des grünen (Polymerpartikel) Kanals orange. Die extrazellulären Partikelanlagerungen weisen auf Partikelaggregationen hin. Ob die Partikel dazu neigen, bei einer höheren Ladungsdichte miteinander zu aggregieren, muss noch geklärt werden. Jurkat- und KG1a-Zellen zeigen zudem weniger grüne Fluoreszenzsignale, was auf eine geringere intrazelluläre Aufnahme hinweist. Außerdem erscheinen bei Jurkat- und KG1a-Zellen die Signale der Partikel in den Zellen ähnlich intensiv.

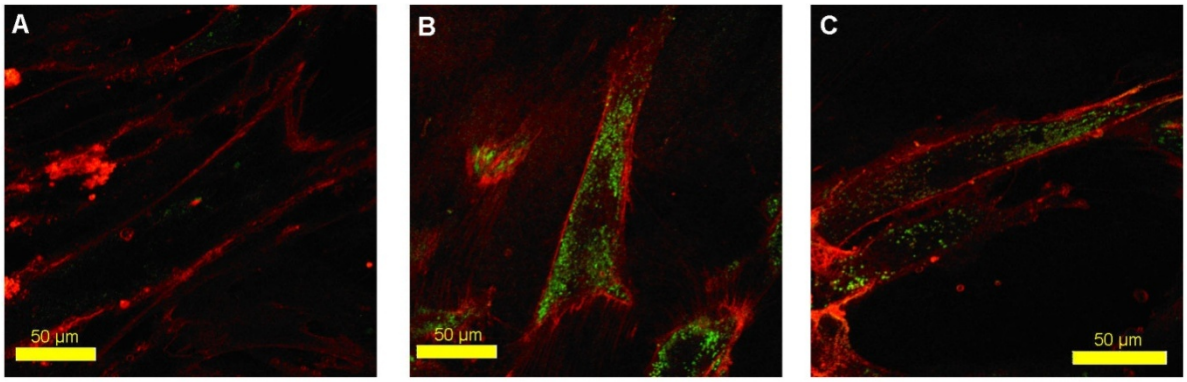


Abbildung 22**:** LSM-Analyse von MSC nach 24 stündiger Inkubation mit den grün fluoreszierenden Polymerpartikeln VHPM5 (B) und VHPM20 (C). Die Zellmembran wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff RH414 rot angefärbt, um die Zellen besser voneinander abzugrenzen, während die fluoreszierenden Partikel als grüne Signale in den Zellen detektiert wurden. Die Negativkontrolle, bei der keine Zugabe von Partikeln erfolgte, zeigt kaum Fluoreszenz im grünen Kanal (A).

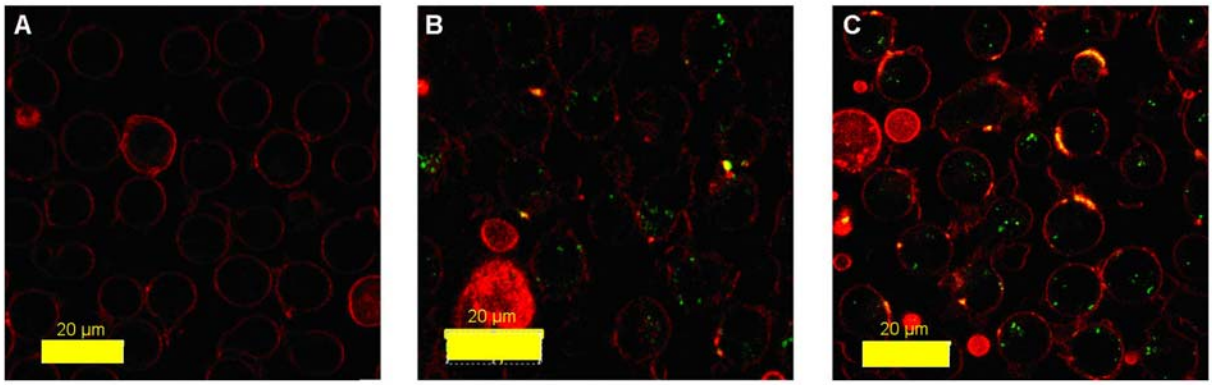


Abbildung 23**:** LSM von Jurkat nach 24 stündiger Inkubation mit den Polymerpartikeln VHPM5 (B) und VHPM20 (C). Die Partikel sind als grüne Signale in den Zellen zu erkennen. Bei der Negativkontrolle(A) befinden sich keine grünen Fluoreszenzsignale in den Zellen.

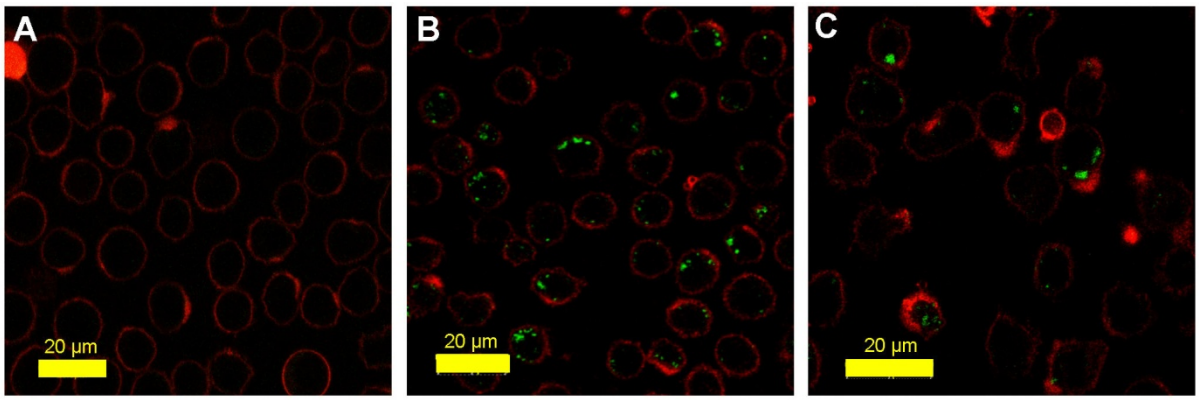


Abbildung 24: LSM von KG1a nach Inkubation mit den Polymernanopartikeln VHPM-5 und VHPM-20. Bei der Negativkontrolle (A) sind keine grünfluoreszierende Partikel zu erkennen. Nach 24 h Inkubation mit den Partikeln VHPM-5 (B) und VHPM-20 (C) befinden sich grüne Fluoreszenzsignale in den Zellen.

5.2.3 TEM

Um detailliertere Aussagen über die Verteilung der Partikel im Zytoplasma machen zu können, wurden TEM-Versuche durchgeführt. Die Auflösung der TEM-Aufnahmen erlaubt die Beobachtung einzelner Partikel oder Partikelcluster an der Zellmembran oder im Zytoplasma. Nach 24 stündiger Inkubation mit den Polymerpartikeln wurden die Zellen unter dem TEM betrachtet. Bei MSCs wurden intrazellulär lokalisierte Nanopartikel detektiert (siehe Abbildung 25 A, MSC). Die Partikel befinden sich in

membranumhüllten Zellkompartimenten, die Endosomen ähneln. Jurkat- und KG1a-Zellen zeigten nur sehr wenige intrazellulär lokalisierte Partikel. Es sind an vielen Bereichen der Zellmembran extrazelluläre Partikelanlagerungen zu finden (Abbildung 25 B Jurkat-Zelle).

Die intrazelluläre Aufnahme der Partikel zeigt, dass die Carboxylgruppen auf den Nanopartikeln intrazelluläre Aufnahme ohne Verwendung eines Transfektionsmittels ermöglichen. Dabei hängt die Partikelaufnahme von der jeweiligen Zelllinie ab. Bei den adhärenten Zelllinien HeLa und MSC scheint die Partikelaufnahme durch andere Faktoren und Eigenschaften der Partikel beeinflusst zu werden als bei der Suspensionszelllinie Jurkat. Hierbei könnte zum Beispiel die Partikelgröße oder auch die Stärke der Partikelkoagulation eine Rolle spielen, wodurch ein unterschiedliches Endozytoseverhalten bei den beiden Zelllinien hervorgerufen werden könnte, denn die endozytotischen Eigenschaften scheinen sich bei den verschiedenen Zelllinien zu unterscheiden. Aber auch die Anzahl der Microvilli könnte das Endozytoseverhalten beeinflussen. Denn bei Aufnahmemechanismen wie der der Makropinozytose [219], die bei der beobachteten Partikelaufnahme erfolgen könnte, sind Microvilli bzw. Pseudopodien maßgeblich beteiligt [220]. Die Aufnahmemechanismen der verschiedenen Zelllinien müssen in Folgearbeiten noch untersucht werden.

In KG1a-Zellen wurden keine intrazellulären Partikel gefunden. Das könnte in der Beobachtung zu begründen sein, dass nur wenig Partikel von den Zellen aufgenommen wurden, die beim Schneiden der Probe daher schwer zu treffen sind.

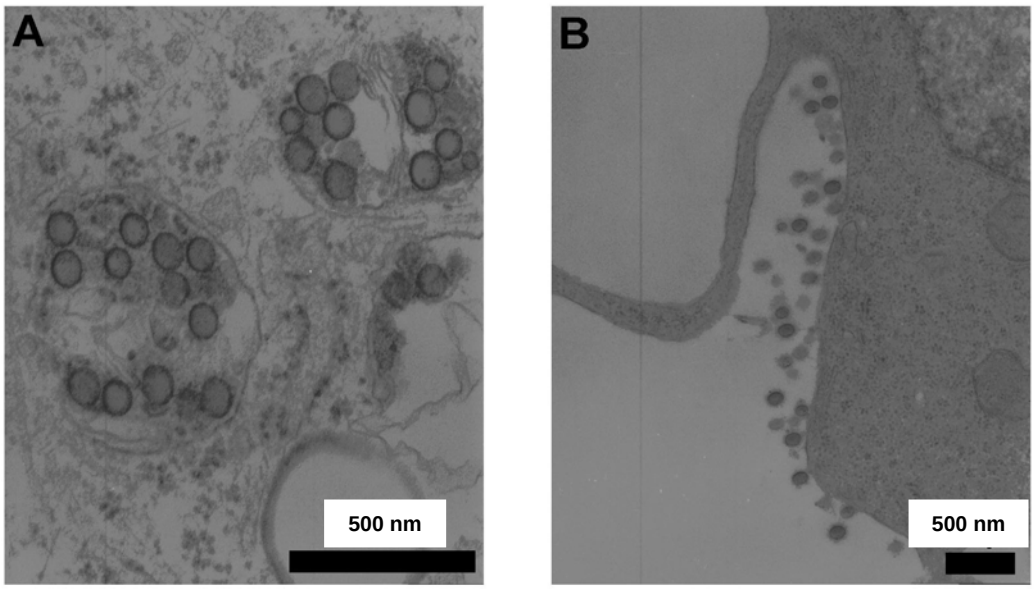


Abbildung 25**:** TEM-Aufnahme nach Inkubation von MSC und Jurkat-Zellen mit dem Polymerpartikel VHPM20k. In MSCs sind im Zytoplasma Partikelanreicherungen in membranumhüllten Zellkompartimenten zu sehen (A), während bei Jurkat-Zellen die meisten Partikel extrazellulär an die Zellmembran angelagert sind (B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Zellen auch ohne die Verwendung eines Transfektionsmittels effizient mit funktionalisierten Nanopartikeln mit anionischen Gruppen auf der Oberfläche markiert werden können.

5.3 Partikel mit Aminogruppen auf der Oberfläche

5.3.1 Aminogruppenfunktionalisierte Partikel mit uneinheitlichem Durchmesser

Nachdem sich herausstellte, dass negativ geladene Carboxylgruppen die Aufnahme der Partikel in die Zellen beeinflussen, sollten nun auch positiv geladene Gruppen wie Aminogruppen hinsichtlich der Aufnahme in verschiedene Zelllinien charakterisiert werden. Positiv geladene, kationische Moleküle besitzen im Gegensatz zu negativ geladenen Molekülen eine große Bedeutung als Transfektionsmittel [134, 178, 210]. Da die meisten Transfektionsmittel jedoch toxisch und nicht für klinische Anwendungen zugelassen sind, wäre die Möglichkeit, Zellen ohne den Einsatz eines Transfektionsmittels effektiv zu transfizieren, sehr wünschenswert.
So wurden mittels Miniemulsionsprozess eine Reihe an Polystyrolpartikeln synthetisiert, wobei der Gehalt an Aminogruppen auf der Partikeloberfläche durch die Zugabe des Monomers (AEMH) variiert wurde. Die Partikel besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Aminogruppen auf der Oberfläche und unterscheiden sich zusätzlich durch ihren Partikeldurchmesser (Tabelle 3). Der Fluoreszenzfarbstoff PMI wurde in die Partikel eingeschlossen, um diese für eine Detektion zugänglich zu machen.

Tabelle 3: Fluoreszierende Polymernanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an Aminogruppen auf der Oberfläche. Durch Erhöhung der bei der Synthese eingesetzten AEMH entstehen Partikel mit einem zunehmenden Gehalt an Aminogruppen auf der Oberfläche und ansteigendem Partikeldurchmesser.

Probenname	Aminogruppen pro Partikel	Aminogruppen pro nm^2	Partikelgröße [nm]
HF3	5970	0,07	169
HF4	12.500	0,09	206
HF5	36.100	0,10	337
HF11	455.900	0,61	489
HF6	78.900.000	15,11	1290
AM-NSL-PM2	8100	0,06	214

5.3.1.1 HeLa-Zellen und MSCs

5.3.1.1.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen im FACS

Die Quantifizierung der zellulären Aufnahme der funktionalisierten Partikel erfolgte mittels FACS. Da jede Partikelpräparation (HF3, HF4, HF5, HF11 und HF6) einen unterschiedlichen Gehalt an fluoreszierendem Farbstoff enthielt (eingebetteter Farbstoff (icDye), angegeben als w/w), wurde der Mittelwert der Fluoreszenz-intensität mean des FL1 Kanals auf das ungeladene Partikel normalisiert (Beschreibung in Material und Methoden 4.2). Die Effizienz der Partikelaufnahme kann so verglichen werden. Nachdem die HeLa-Zellen 24 h lang mit den Partikeln HF3, HF4, HF5, HF11 und HF6 inkubiert wurden, zeigte die FACS-Messung bei Zellen, die mit den positiv geladenen Polymerpartikeln inkubiert waren, eine signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität als die Negativkontrolle. Abbildung 26 zeigt außerdem eine Korrelation zwischen positiver Oberflächenladung und der gemessenen Fluoreszenzintensität bei HeLa-Zellen. Die relative Fluoreszenzintensität steigt stetig von ungeladenen Partikeln (P1) bis zu Partikeln mit hoher Oberflächenladung (HF6; Aminogruppen/nm^2:15,11).
Das Experiment wurde anschließend mit MSCs durchgeführt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei MSCs zunächst eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenzintensität bei HF3 und HF4 (Abbildung 27). Diese Zunahme auf den Anstieg der Oberflächenladung zurückzuführen sein, die bei Partikel HF4 doppelt so hoch ist wie bei Partikel HF3. Der Durchmesser der Partikel scheint hier keine Rolle zu spielen, da er keine starken Abweichungen besitzt. Außerdem zeigt die Abbildung 27 bei HF3 und HF4 eine höhere gemessene Fluoreszenzintensität als bei HeLa-Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit den Partikeln HF5, HF11 und HF6 erfolgt eine langsame aber kontinuierliche Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität. Neben dem erheblichen Anstieg der Oberflächenladung steigt auch der Partikeldurchmesser in der Reihenfolge HF5, HF11 und HF6 beträchtlich an. Bei Partikel HF6 erreicht er sogar den Größenbereich eines µm. Die Aminogruppen könnten, wenn sie in sehr hoher Anzahl auf der Partikeloberfläche vorliegen, Knäuelstrukturen ausbilden, so dass die Partikel miteinander interagieren und Aggregate bilden, was die Aufnahme in die Zellen erschweren könnte. Auch der erhebliche Anstieg des Partikeldurchmessers könnte die Aufnahme der Partikel in die Zelle erschweren oder verlangsamen. Es ist zu vermuten, dass andere Faktoren der Partikelpräparation bei MSCs die Aufnahmerate an Partikeln oder deren Anhaften an die Zellmembran beeinflussen. Diese Faktoren könnten z.B. die Partikelgröße und Stärke der Partikelkoagulation im Medium beinhalten. Es wäre auch hier denkbar, dass die hohe Dichte an Pseudopodien bei den MSCs für das unterschiedliche Verhalten

verantwortlich ist und zum Beispiel den starken Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität bei Partikel HF3 und HF4 bedingt. So könnte das Anhaften der Partikel an die Pseudopodien auch von der Partikelkoagulation oder der Partikelgröße abhängen.

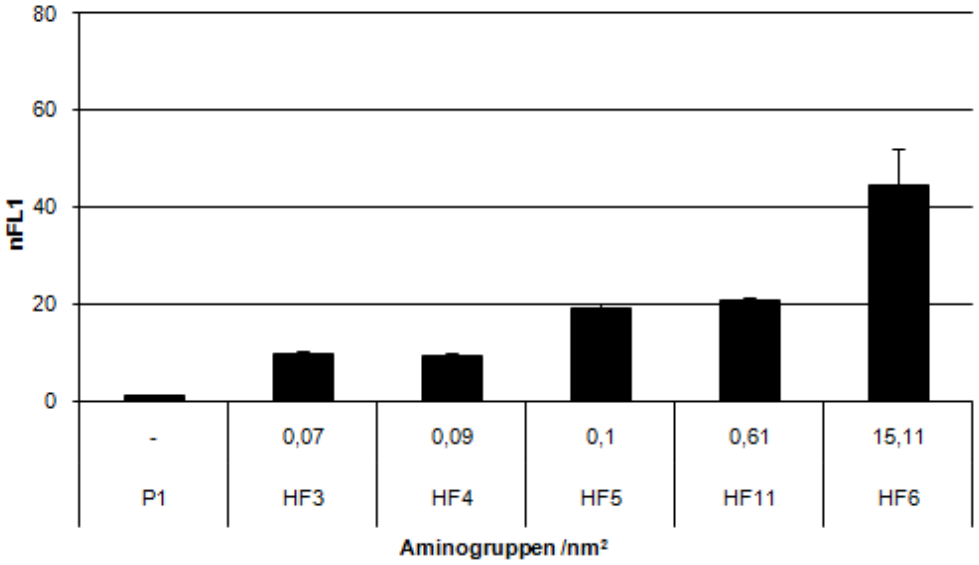


Abbildung 26**:** FACS-Messungen von HeLa-Zellen, die 24 h lang mit fluoreszierenden Polymerpartikeln inkubiert wurden. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde hinsichtlich der Einlagerungsausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes PMI normalisiert. Die Partikel sind nach der Oberflächenladung pro Partikel in ansteigender Reihenfolge angeordnet.

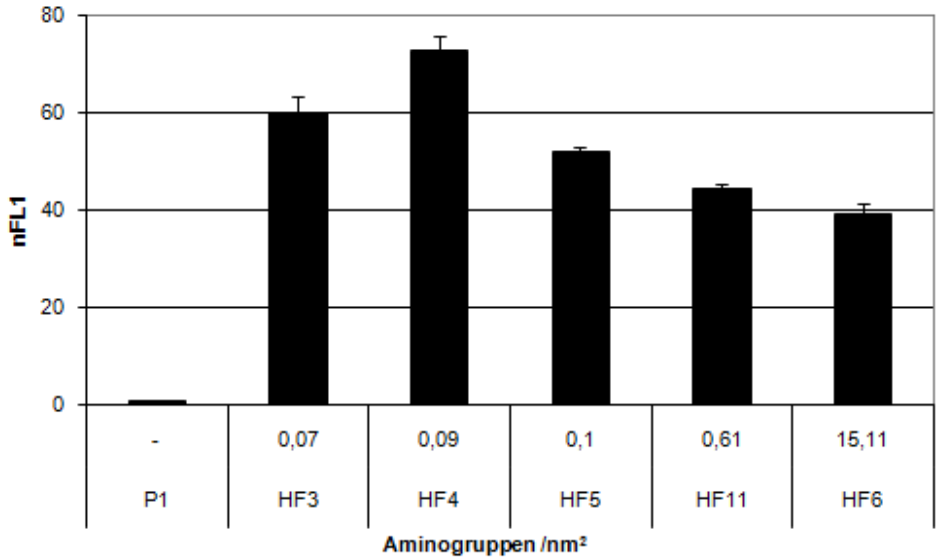


Abbildung 27: FACS-Messungen von MSCs nach 24 h Inkubation mit fluoreszierenden Polymerpartikeln. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde hinsichtlich der Einlagerungsausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes PMI normalisiert.

5.3.1.1.2 Lokalisation der Partikel mittels CLSM

Um die intrazelluläre und extrazelluläre Lokalisation der Partikel zu analysieren, wurde das CLSM eingesetzt. MSCs wurden 24 h mit den aminofunktionalisierten Partikeln HF3, HF4, HF5 HF11 und HF6 inkubiert und anschließend unter dem CLSM betrachtet. Der äußere Bereich der Zellmembran wurde mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff RH414 angefärbt, um die Zellen voneinander abzugrenzen und zwischen intrazellulär und extrazellulär lokalisierten Partikeln unterscheiden zu können. Die Negativkontrolle, die nicht mit Partikeln behandelt wurde, zeigte keine Grünfluoreszenz (Abbildung 28 A). Bei MSCs, die mit HF3 und HF4 inkubiert wurden, waren die meisten grünen Fluoreszenzsignale intrazellulär lokalisiert (Abbildung 28 B und C). Bei HF5 wurde sowohl eine intrazelluläre Aufnahme bei MSCs und HeLas festgestellt als auch ein bedeutender Anteil an extrazellulären Partikelanlagerungen an die Zellmembran (Abbildung 28 D). Durch die rot gefärbte Zellmembran und die grün fluoreszierenden Partikel entstehen im Overlay in diesem Bereich gelbe Pixel Abbildung 28 D für MSCs). Die Partikel HF11 und HF6 zeigen eine zunehmende Koagulation, wobei die Partikelaggregate auch nach dem Waschen auf dem Deckglas angelagert waren. Die Partikel HF 11 und HF6 (Abbildung 28 E und F) konnten intrazellulär und extrazellulär gefunden werden, wobei es sich auch hier bei den extrazellulären Partikelanlagerungen um Aggregate handeln dürfte. Bei der Aggregatbildung könnte auch die Interaktion der stark positiven Oberfläche mit den Serumproteinen im Medium beteiligt sein. Es wurden keine grünen Fluoreszenzsignale im Zellkern gefunden. Die in den Zellen zu erkennenden grünen Fluoreszenzsignale deuten auf eine intrazelluläre Lokalisation der Partikel hin. SEM- und TEM-Analysen sollten nun eine genauere Lokalisation der Partikel oder Partikelaggregate intra- und extrazellulär ermöglichen und klären, ob es sich bei den intrazellulären Fluoreszenzsignalen um einzelne Partikel oder Partikelaggregate handelt. Ferner soll geklärt werden, ob sich die Partikel frei im Zytoplasma befinden oder in Endosomen bzw. Lysosomen. Auch die extrazellulären Partikelanlagerungen sollen näher charakterisiert werden. Für HeLa-Zellen liegen keine entsprechenden Daten vor.

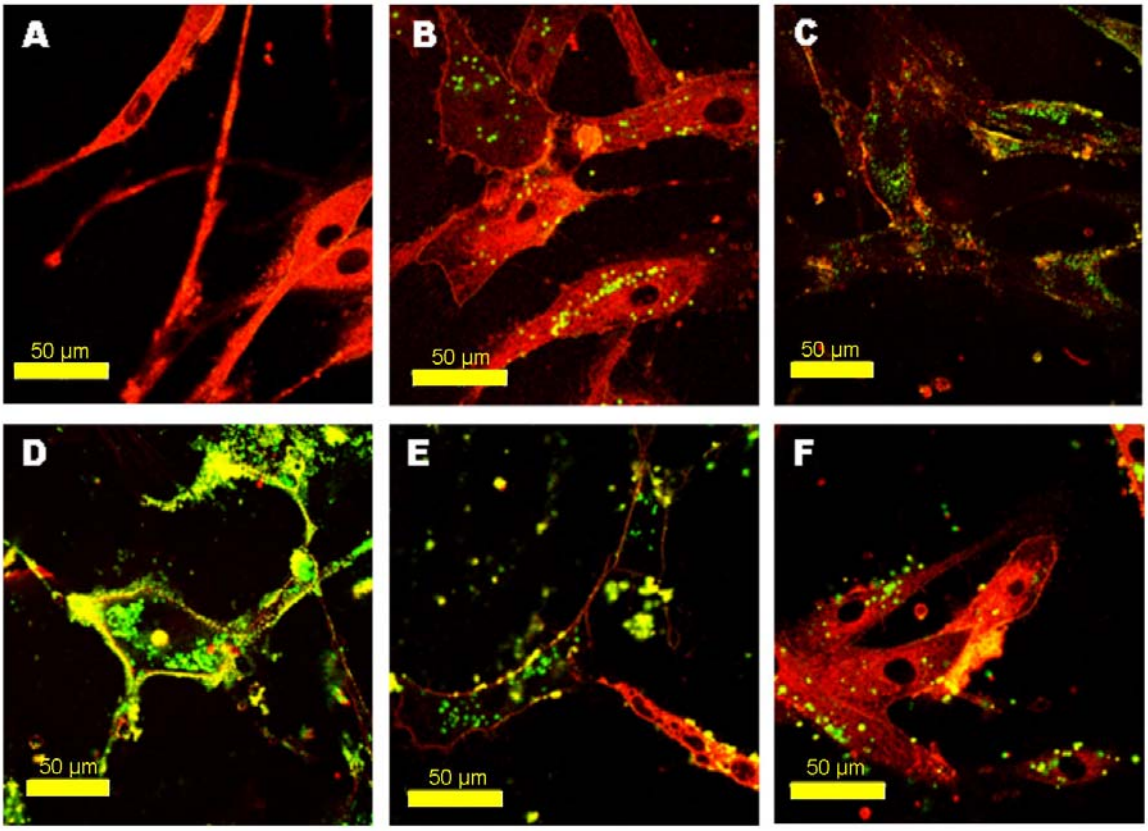


Abbildung 28: A) Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von MSCs ohne vorherige Inkubation mit Partikeln. B)-F): LSM von MSCs nach 24 stündiger Inkubation mit Nanopartikeln. Die fluoreszierenden Partikel werden im grünen Kanal gezeigt. RH414 (roter Kanal) färbt die Zellmembran und die intrazellulären Kompartimente, gelb zeigt den Overlay von rot und grün. B) HF3, 0,07 Aminogruppen/nm^2 C) HF4, 0,09 Aminogruppen/nm^2 D) HF5, 0,10 Aminogruppen/nm^2 E) HF11, 0,61 Aminogruppen/nm^2 F) HF6 15,11 Aminogruppen/nm^2.

5.3.1.1.3 Lokalisation der Partikel mittels TEM und SEM

TEM- und SEM-Studien wurden mit MSCs und HeLa-Zellen durchgeführt, da mit diesen Methoden eine Visualisierung der Partikel und einzelner Strukturen in der Zelle ermöglicht wird. Dabei dienten die TEM-Untersuchungen der Analyse der intrazellulären Partikelverteilung, während mittels SEM-Analyse die extrazellulären Partikelanlagerungen charakterisiert werden sollten.
MSCs und HeLa-Zellen wurden 24 h mit Partikel HF3 und HF5 inkubiert. Die TEM-Analyse zeigt die Partikelcluster in intrazellulären Kompartimenten in MSCs (Abbildung 29 A: HF3; B: HF5) und HeLa (Abbildung 29 C: HF3; D: HF5). Optimale Aufnahmen ohne einen hohen Anteil an extrazellulären Anlagerungen an der

Zellmembran wurden bei Partikel HF3 beobachtet. Besonders viele Partikelanlagerungen an die Zellmembran zeigten Zellen, die mit Partikel HF5 inkubiert wurden (Abbildung 29 B). Hier wurde auch elektronendichtes Material gefunden, das diese Partikel umgab (Abbildung 29 B). Es könnte sich dabei um Serumproteine handeln, die diese Partikel miteinander verbinden und dadurch zur Partikelaggregation führen. Höhere Oberflächenladungen resultierten in einer Koagulation der Partikel im Zellkulturmedium. FACS-Analyse des Zellgates und des Partikelgates bestätigt die hohe Partikelkoagulation bei Partikeln mit einer hohen Oberflächenladung (siehe Partikelkoagulation). Dies könnte auch die Endozytose der Zellen verhindern. In den beiden adhärenten Zelllinien (MSCs und HeLa) ähnelten diese Zellkompartimente Endosomen. Es konnte keine Partikelaufnahme in das endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien und Strukturen des Golgi-Apparates sowie dem Zellkern beobachtet werden. Die Anreicherung PEG-beschichteter Partikel in Lysosomen wurde bereits beschrieben [8]. Gupta et al. zeigten, dass die Endozytose unbeschichteter Partikel die Zerstörung der Zellmembran und des Zytoskeletts bewirkt. In dieser Arbeit wurden für geladene und ungeladene Partikel jedoch keine derartigen Effekte in den TEM-Studien beobachtet. Im TEM wurden nur selten einzelne Partikel gefunden, die nicht von einer intrazellulären Membran umgeben waren. Einige Arbeitsgruppen fanden jedoch auch, dass die von ihnen untersuchten Partikel im Zytoplasma lokalisiert waren [221, 222]. In Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich zu klären, ob diese Partikel im Zytoplasma lokalisiert waren oder ob durch den vorderen oder hinteren Bereich einer Organelle geschnitten worden war, so dass nur ein Partikel sichtbar wurde. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die auch schon Partikel im Zellkern gefunden haben [221], wurden in dieser Studie, wie bereits erwähnt, keine Partikel im Zellkern gefunden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können unter anderem dadurch erklärt werden, dass bei diesen Arbeitsgruppen eine andere Oberflächenfunktionalisierung der Partikel, wie z.B. Motive vom TAT-Protein, verwendet wurden [221].

Um die extrazellulären Partikelanlagerungen weiter zu untersuchen, wurde eine SEM-Analyse durchgeführt. MSCs wurden 2 h mit Partikel HF5 inkubiert. Unter dem SEM wurde eine erhebliche Anzahl extrazellulär an die Zellmembran angelagerter Partikel beobachtet (Abbildung 30 A und B). Die Partikel waren jedoch nicht einzeln über die Zelloberfläche verteilt, sondern in Clustern angeordnet. Einige dieser Cluster waren von den Microvilli der Zellen umschlossen (Abbildung 30 A) und erreichten einen Durchmesser von bis zu einem µm bis zu mehreren µm. Da auch nach 24 h Inkubation der Partikel mit den Zellen im TEM neben intrazellulär lokalisierten Partikeln viele extrazelluläre Partikelaggregate gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass Partikelaggregate mit einem derartigen Durchmesser nur langsam

von den Zellen aufgenommen werden und die Aufnahme erschwert ist. Welcher Aufnahmemechanismus bei der Endozytose der Zellen vorliegt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose darf der maximale Partikeldurchmesser 200 nm nicht überschreiten [223]. Daher ist dieser Aufnahmemechanismus bei den hier untersuchten Partikeln mit einem Durchmesser von mehr als 300 nm sehr unwahrscheinlich. Es könnte sich um einen Caveolae-vermittelten Aufnahmemechanismus handeln, da bei diesem Aufnahmemechanismus Partikel mit einem Durchmesser größer als 200 nm bis zu 1 µm Durchmesser aufgenommen werden [223]. Aufgrund der Beteiligung der Microvilli oder Pseudopodien beim Anlagerungsprozess und vermutlich auch beim Aufnahmeprozess der Partikel, scheint die Makropinozytose als Endozytosemechanismus am ehesten beteiligt zu sein. Dabei werden neben flüssigen Substanzen auch partikuläre Bestandteile bis in dem Größenbereich von Mikrometern aufgenommen [223]. Makropinozytose kommt anders als die Phagozytose, die bei Makrophagen eine Rolle spielt, auch bei nicht spezialisierten Zellen vor.

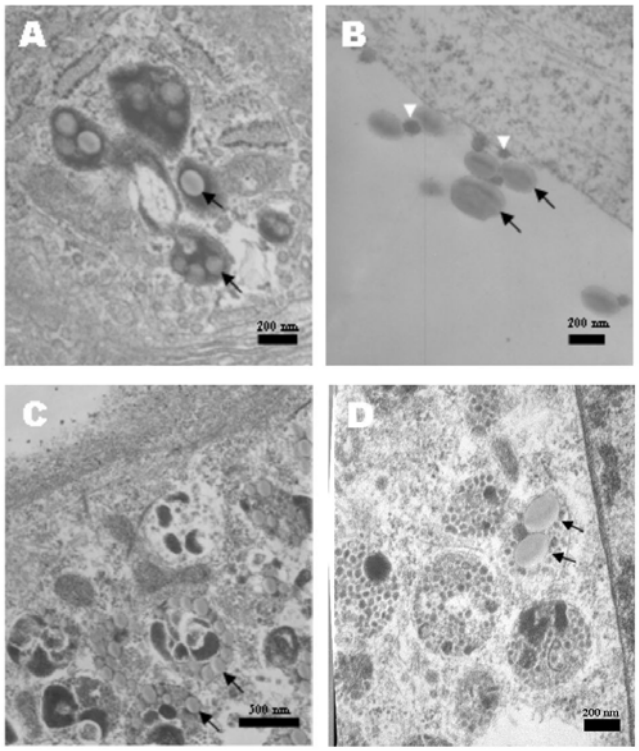


Abbildung 29: (A) TEM-Analyse von MSCs nach 24 stündiger Inkubation mit Partikel HF3. Die Partikel (schwarze Pfeile) befinden sich in intrazellulären Kompartimenten, die Endosomen ähneln. (B) MSCs nach 24 stündiger Inkubation mit Partikel HF5. Die Partikel sind an die Zellmembran angelagert (schwarze Pfeile). Zwischen den angelagerten Nanopartikeln (weiße Pfeilköpfe) befindet sich elektronendichtes Material. HeLa-Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit HF3 (C) und HF5 (D). Die Partikel sind in Zellorganellen lokalisiert (Pfeile).

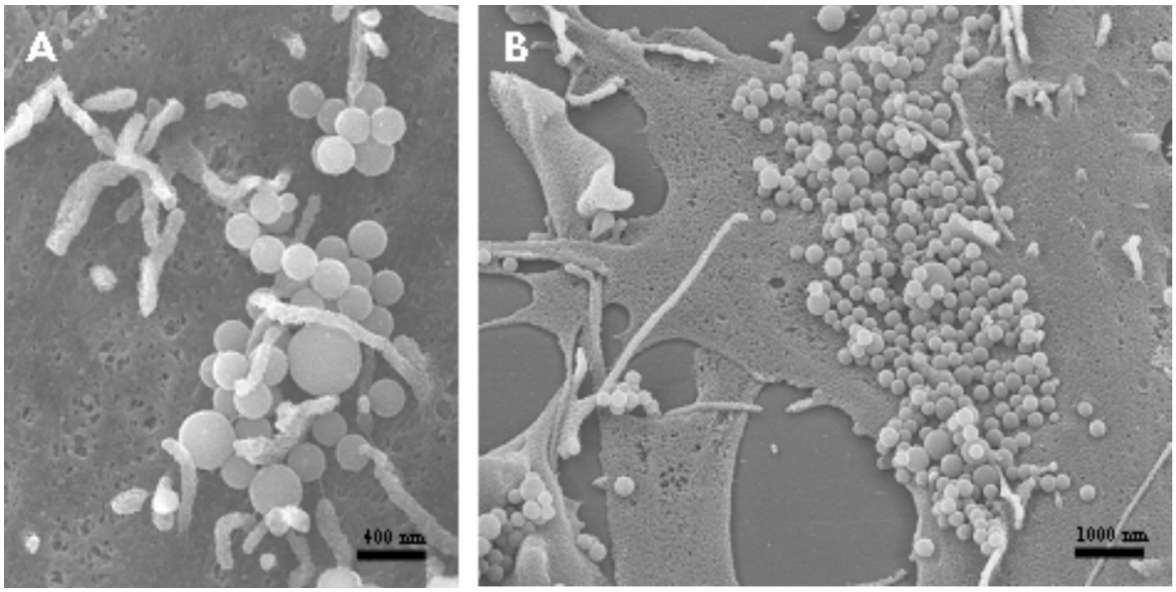


Abbildung 30: A): SEM Analyse von MSCs nach 2 stündiger Inkubation mit Partikel HF5. Partikelaggregationen haben sich an die Zellmembran angelagert. Diese Aggregationen sind von Microvilli umgeben. B): SEM Analyse von Partikel HF5 auf MSCs. Nach 2 stündiger Inkubation sind Partikelaggregationen, die sich an die Zellmembran angelagert haben, zu finden. Das Bild zeigt eine Zelle in der Übersicht.

5.3.1.1.4 Partikelkoagulation

Zur Bestimmung der Partikelkoagulation wurden HeLa-Zellen zunächst 24 Stunden mit den Partikeln HF5 und HF11 inkubiert. Die Partikelkoagulation wurde im FACS gemessen, wobei Zellen und Partikel aufgrund des Größenunterschieds (Vorwärtsstreuung, FSC) und ihrer Granularität (Seitwärtsstreuung, SSC) voneinander unterschieden wurden. Dabei konnte die Menge an Partikelaggregaten durch die Darstellung der gemessenen Ereignisse der lebenden Zellen in der größeren Fraktion (R1-Gate, auch Zell-Gate) und die gemessenen Ereignisse der Partikel in der kleinen granulären Fraktion (R1-Gate, auch Partikel-Gate) quantifiziert werden (Abbildung 31C und D). Die Negativkontrolle zeigt im Partikel-Gate nur sehr wenige Ereignisse, die aufgrund der geringen Größe Zelltrümmer darstellen dürften. Bei Partikelpräparationen, die bei Messungen der Fluoreszenzintensität eine hohe Aufnahmerate in Zellen gezeigt haben, wurde eine Verschiebung der Zellfraktion im SSC beobachtet (Abbildung 31C und D). Eine Erklärung dafür ist, dass Zellen, deren Endosomen viele Partikel enthalten, auch granulärer sind und somit verstärkt Licht streuen. Die auftretende Partikelaggregation bei Experimenten mit HeLa-Zellen wird in Tabelle 4 gezeigt. Mit steigender Oberflächenladung erfolgt eine kontinuierliche Zunahme der Ereignisse in R2, was eine stärkere Koagulation anzeigt. Dieses Verhältnis von ansteigender Partikelladung und Partikelaggregation wurde auch im LSM und TEM bei Partikel HF 5 beobachtet. Während die Partikel in wässriger Suspension nach wochenlanger Lagerung nicht koagulierten, zeigte sich eine Partikelkoagulation nach Zugabe der Partikel ins Zellkulturmedium. Diese war stärker ausgeprägt, wenn sich mehr Proteine im Medium befanden. Daher wurde besonders im MSC-Medium, das 20% FCS enthält, Koagulation beobachtet, während weniger Koagulation in dem Medium mit 10% FCS erfolgte. Die beste Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass Proteine im Medium an die Oberfläche von Partikeln adsorbieren und es dadurch zur Vernetzung benachbarter Partikel kommt. Durch die Koagulation der Partikel entstehen große Aggregate, die die Aufnahmerate in die Zellen vermindern könnten. Dies könnte auch die Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität im FACS bei Partikeln mit hoher Oberflächenladung erklären (siehe Fluoreszenzintensitätsmessung Abbildung 27).

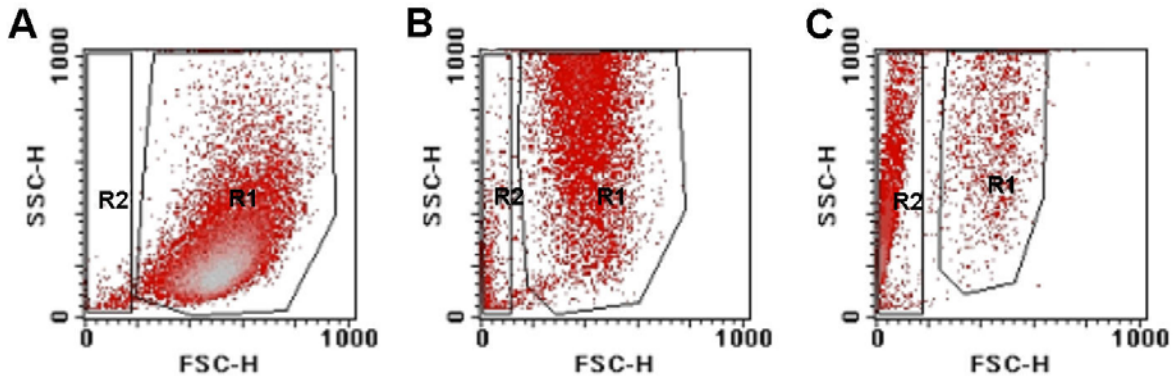


Abbildung 31: FACS Analyse von HeLa Zellen (Medium 10% FCS), die 24 h über Nacht mit verschiedenen Nanopartikeln inkubiert wurden. A) Im Kontrollexperiment (NK, HeLa ohne Nanopartikel) waren im R2 Gate (Partikel-Gate) nur wenige Ereignisse zu finden, die Debris darstellen, während in B) die koagulierten HF5-Nanopartikel klein (niedriger FSC) und granulär (hoher SSC) erscheinen. Die Ereignisse in R1 (Zell-Gate) zeigen höhere Werte im SSC, was auf eine Aufnahme in Zellorganellen oder Anlagerung außen an die Zellmembran hinweist. C) Bei HF11 befinden sich die meisten Ereignisse im R2 Gate.

Tabelle 4: Koagulation der Partikel HF5 und HF11.

	NK	HF5	HF11
R1 Zellgate (Events)	19622	15769	1572
R2 Partikelgate (Events)	304	4019	18347

5.3.1.1.5 Kinetik der Partikelaufnahme

Um Aufnahmekinetiken fluoreszierender Polymerpartikel zu erhalten, wurde ein positiv geladener Partikel (siehe Tabelle 3) mit HeLa-Zellen inkubiert und die Fluoreszenzintensität nach 0 und 1 min und nach 1, 2, 4, 8 und 24 h gemessen. Die Quantifizierung der Partikelaufnahme oder Anlagerung an die Zellmembran erfolgte mittels FACS-Analyse. Abbildung 32 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Sättigung ist nach 25-stündiger Inkubation noch nicht ganz erreicht. Dennoch scheint die Aufnahme für die meisten Anwendungen auszureichen. Im LSM, das 2 h nach der Partikelzugabe zu MSCs den Verlauf der Partikelanlagerung an die Zellmembran bzw. Partikelaufnahme in die Zellen festhielt, zeigte sich bereits in den ersten Minuten eine Anlagerung der

Partikel an die Zellmembran. Nach 15 min treten Partikelaggregationen im Medium auf, die sich an die Zellmembran anlagern und es sind erste intrazelluläre Partikelanreicherungen zu erkennen, die mit zunehmender Inkubationszeit größer werden. Die Partikelaufnahme korreliert mit der Inkubationsdauer, das heißt mit zunehmender Inkubationsdauer erfolgt ein Anstieg der grünen Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zelle, der auf einen höheren Anteil an intrazellulären Partikeln hindeutet (Abbildung 33).

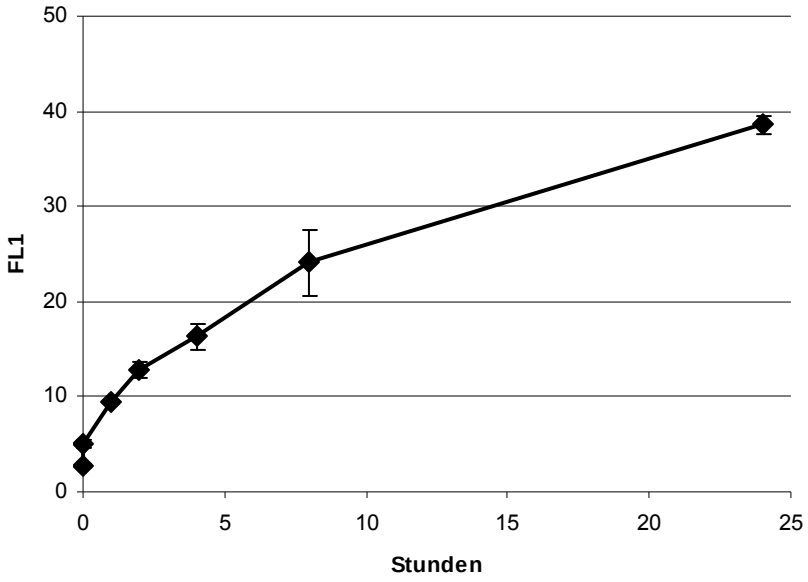


Abbildung 32: FACS-Messung von HeLa-Zellen nach Inkubation mit positiv geladenen Partikeln (NSL2, 8.100 Aminogruppen pro Partikel) in Zeitintervallen von 0 und 1 min und 5, 10, 15, 20 und 24 h. Die Abbildung zeigt eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die Sättigung ist nach 24 Stunden noch nicht ganz erreicht.

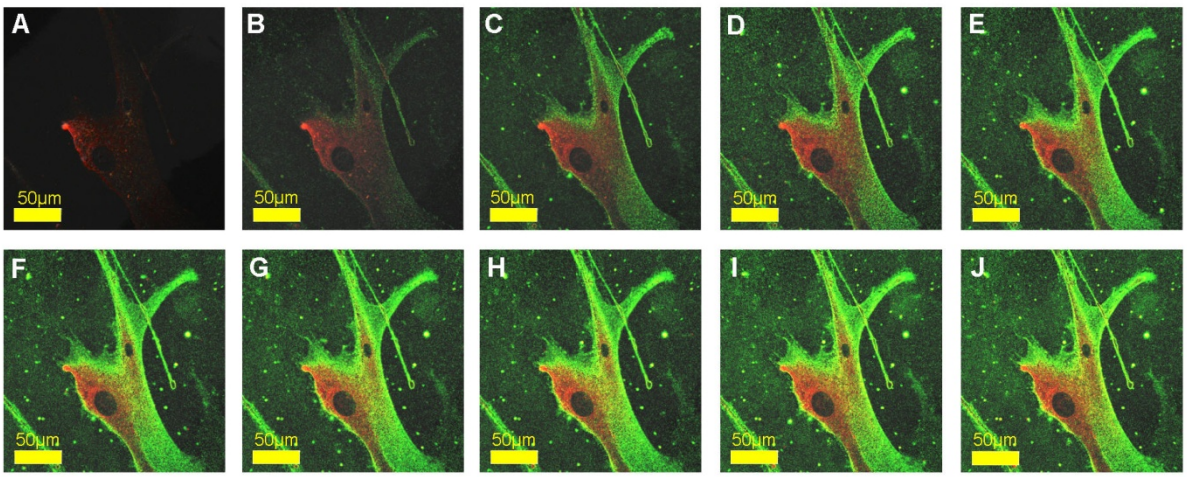


Abbildung 33: Zeitraffer-LSM einer mesenchymalen Stammzelle nach Zugabe von Partikel HF3. Die Bilder sind nach ansteigender Inkubationsdauer angeordnet (0, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 und 86 min).

5.3.1.2 KG1a- und Jurkat-Zellen

5.3.1.2.1 *FACS-Analyse*

Jurkat-Zellen wurden als Modell für T-Zellen und KG1a-Zellen als Modell für CD34-positive hämatopoetische Stammzellen ausgewählt. FACS-Messungen beider Zelllinien wurden nach 24 h Inkubation mit den Partikeln P1, HF3, HF4, HF5, HF11 und HF6 durchgeführt. Sie zeigen keine eindeutige Korrelation zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Anzahl an Aminogruppen/nm^2 (siehe Abbildung 34 A und B). HF6 zeigt bei beiden Zelllinien und HF5 bei KG1a-Zellen eine sehr hohe Fluoreszenzintensität. Die hohe Fluoreszenzintensität könnte auf der Eigenschaft der Partikel, Aggregate zu bilden, die sich extrazellulär an der Zellmembran anlagern, beruhen, da bei HF5 und HF6 die Koagulationsmessungen der Partikel am FACS bei HeLa-Zellen auf eine starke Partikelkoagulation hinweisen (siehe Kapitel Partikelkoagulation 5.3.1.1.4). Um dem nachzugehen und zwischen extrazellulären Partikelanlagerungen an die Zellmembran und intrazellulären Partikeln unterscheiden zu können, wurden LSM-Analysen durchgeführt.

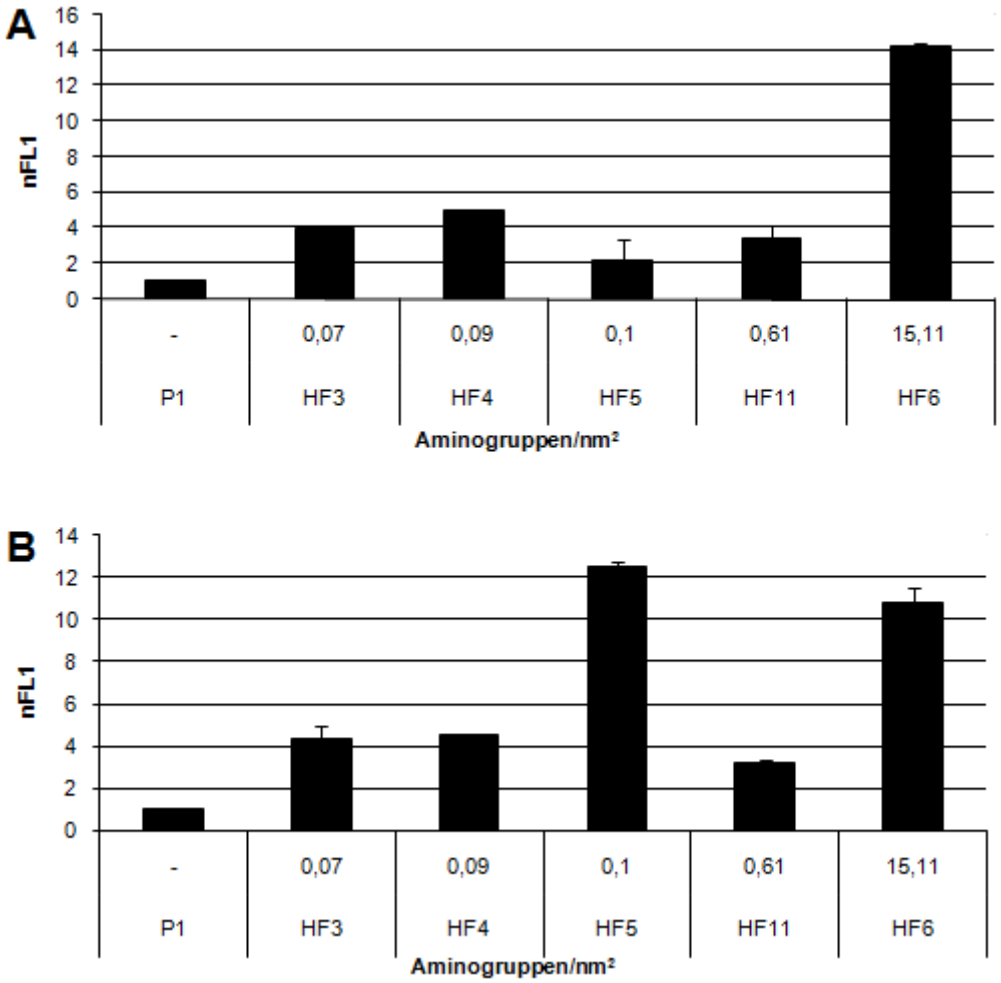


Abbildung 34: FACS Analyse von A) Jurkat Zellen und B) KG1a Zellen, die 24 h mit verschiedenen Nanopartikeln inkubiert wurden. Es wurde keine eindeutige Korrelation zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Menge an NH_2-Gruppen auf der Partikeloberfläche bei beiden Zelllinien gefunden.

5.3.1.2.2 CLSM-Analyse

LSM-Studien erfolgten nach 24 h Inkubation von Jurkat-und KG1a-Zellen mit den Nanopartikeln HF3, HF4 und HF5. Die Negativkontrolle wurde nicht behandelt (Abbildung 35 A) und zeigt unter dem CLSM auch keine grünen Fluoreszenzsignale in den Zellen. Es konnte mittels CLSM-Analyse gezeigt werden, dass sich bei Jurkat- und KG1a-Zellen das Fluoreszenzsignal bei HF3, HF4 und HF5 hauptsächlich auf der Zellmembran befindet. Im Zytoplasma wurde nur wenig Fluoreszenzsignal detektiert, besonders bei Experimenten mit HF3. Diese extrazelluläre Lokalisation der Partikel dürfte nicht auf der Größe der Nanopartikel beruhen, da kleinere Partikel von 169 nm Durchmesser wie HF3 eigentlich besser aufgenommen werden sollten

als größere Partikel wie HF4 und HF5. Wahrscheinlicher ist auch hier, dass die Oberflächenladung und die damit verbundene Aggregatbildung der Partikel eine größere Rolle spielt als der Partikeldurchmesser. Im Gegensatz zu HeLas und MSCs war die Verteilung des Fluoreszenzsignals entlang der Zellmembran in nur wenigen intensiven Bereichen lokalisiert (Abbildung 35: KG1a-Zellen mit HF3, HF4 und HF5; Ergebnisse für Jurkat nicht gezeigt; siehe Abbildung 28 zum Vergleich mit MSCs). Die Unterschiede zwischen HeLa-Zellen und MSCs auf der einen und Jurkat- und KG1a-Zellen auf der anderen Seite könnten in dem unterschiedlichen Endozytoseverhalten der Zellen sowie den Eigenschaften der Partikel, die zum Beispiel unterschiedlich stark koagulieren, begründet sein. Die Aminogruppen könnten, wenn sie in sehr hoher Anzahl auf der Partikeloberfläche wie bei Partikel HF5 vorliegen, miteinander interagieren und Aggregate bilden, was die Aufnahme in die Zellen erschweren könnte, da derartige Partikelaggregate Mikrometer-durchmesser erreichen können (Abbildung 30; MSCs).

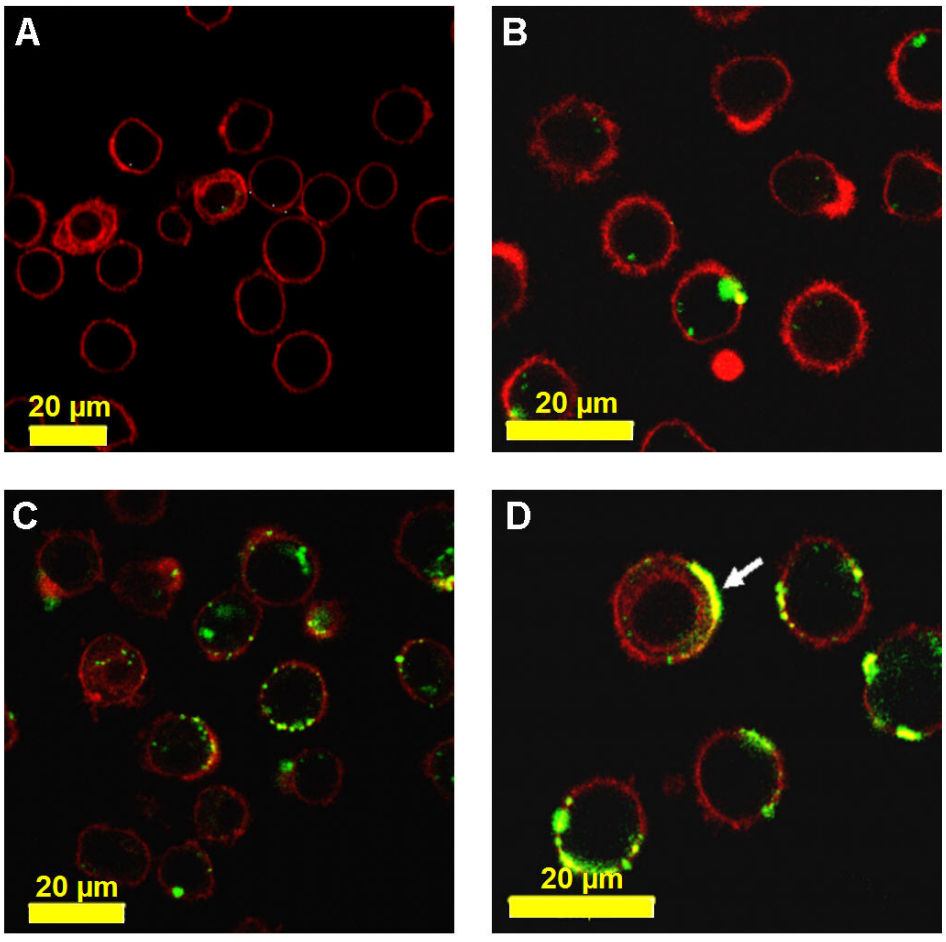


Abbildung 35: A) Kontrolle von KG1a Zellen ohne Nanopartikel. Es wurde mit RH414 angefärbt (roter Kanal), um die Zellgrenzen sichtbar zu machen. Der Farbstoff lagert sich auch in die Membran des Zellkerns ein. B) KG1a Zellen wurden 24 h mit HF3, C) HF4 und D) HF5 (grüner Kanal) inkubiert. Das grüne Signal ist in Clustern auf der Zellmembran lokalisiert (Pfeil).

5.3.1.2.3 TEM-Analyse

TEM-Untersuchungen bestätigten die Lokalisation des Partikels HF4 an der äußeren Seite der Zellmembran. Interessanterweise waren die Partikel in diesen Clustern von Microvilli umgeben, die mit großem Abstand von der Zellmembran in diese Cluster ragen (siehe Abbildung 42). Auch hier befand sich wieder elektronendichtes Material zwischen den Partikeln. Dabei könnte es sich um Serumproteine aus dem Kulturmedium handeln, die die einzelnen Partikel miteinander verbinden. In den TEM-Studien zeigte sich, dass auch hier fast alle Partikel an die Zellmembran angelagert waren, nur wenige Partikel wurden intrazellulär in endosomalen Kompartimenten beobachtet (nicht gezeigt). Es wurden auch hier keine Partikel im Zellkern, dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien gefunden. Die Anlagerung von Partikelaggregaten in einem derartigen Umfang und Durchmesser (mehr als 200 nm) wie bei HF4 scheint die Endozytose bei KG1a-Zellen erheblich zu beeinträchtigen. Vermutlich setzten KG1a-Zellen einen anderen Endozytose-mechanismus als MSCs zur Internalisation der Partikelcluster ein, denn MSCs sind in der Lage, die Partikelcluster in großer Menge aufzunehmen. Ob bei KG1a-Zellen zum Beispiel die Clathrin vermittelte Endozytose oder die Endozytose mittels Caveolae-Vesikel bei der Partikelaufnahme eine Rolle spielen, bei denen kleinere Partikel als 200 nm aufgenommen werden, bleibt noch zu untersuchen.

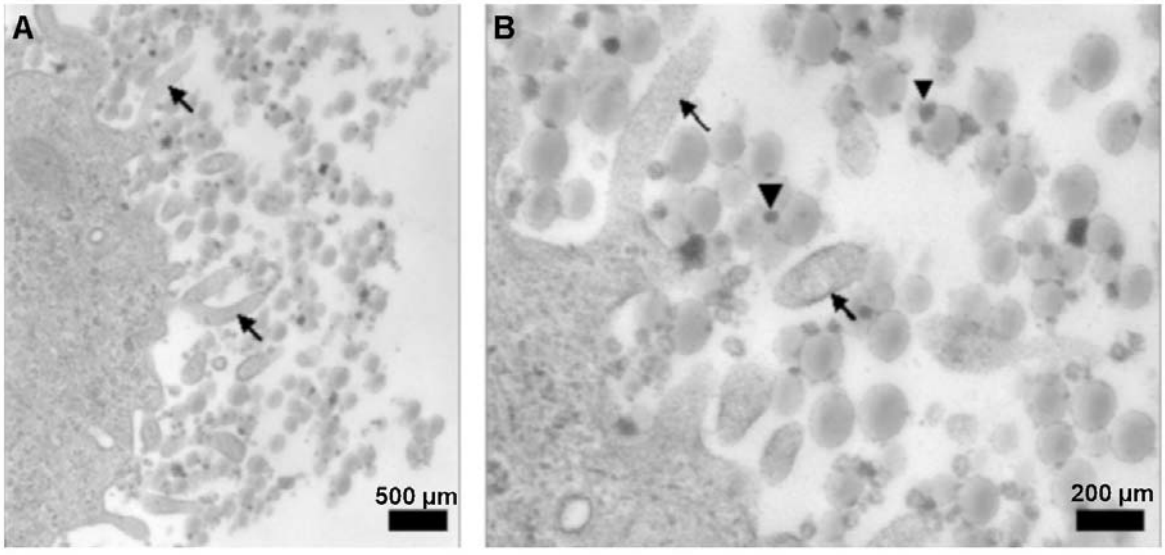


Abbildung 36: TEM Analyse von KG1a-Zellen, die 24 h mit Partikel HF4 inkubiert wurden. Die Abbildung zeigt eine Adhäsion der Partikelcluster an die Zellmembran. Microvilli (Pfeile), die sich zwischen den Partikelclustern und den einzeln verstreuten Nanopartikeln befinden, werden von elektronendichtem Material miteinander verbunden (Pfeilkopf). B) ist ein vergrößerter Ausschnitt von A).

5.3.2 Aminogruppenfunktionalisierte Partikel mit einheitlichem Durchmesser

Es wurde eine 2. Partikelcharge aminogruppenfunktionierter Polystyrolnanopartikel mit einem einheitlicheren Durchmesser als die Partikel HF (siehe Kapitel 5.3) synthetisiert. Das erleichtert die Untersuchung des Einflusses der Oberflächenladung auf die Partikelaufnahme durch Zellen, da hier nur ein Parameter, die Oberflächenladung der Partikel (nicht der Partikeldurchmesser), gezielt variiert wird. Die Partikel wurden mittels Miniemulsionspolymerisationsverfahrens hergestellt, wobei der Gehalt an Aminogruppen auf der Partikeloberfläche durch die Zugabe an Monomer (AEMH) eingestellt wurde (siehe Kapitel 5.3). Die Partikel AM-NSCT0-20 besitzen einen Durchmesser von ungefähr 120 nm (siehe Tabelle 5). Durch Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs PMI in die Polymermatrix der Partikel konnten die Partikel im FACS und CLSM detektiert werden.

Tabelle 5: Fluoreszierende Polystyrolnanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an Aminogruppen auf der Oberfläche. Durch Erhöhung der Monomerzugabe bei der Synthese werden Partikel mit zunehmender Anzahl an Aminogruppen auf der Oberfläche erhalten. Diese Partikel zeichnen sich durch einen relativ einheitlichem Partikeldurchmesser aus.

Probenname	Aminogruppen pro Partikel	Aminogruppen pro nm^2	Partikelgröße [nm]
AM-NSCT-PM0	0	0	110
AM-NSCT-PM1	3265	0,08	114
AM-NSCT-PM2	4809	0,11	118
AM-NSCT-PM3	4811	0,12	113
AM-NSCT-PM5	9623	0,19	127
AM-NSCT-PM10	17218	0,31	133
AM-NSCT-PM15	29319	0,52	134
AM-NSCT-PM20	34895	0,70	126

5.3.2.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS

Zur Untersuchung des Einflusses der positiven Oberflächenladung der Partikel auf die Zellaufnahme wurden HeLa, MSC, Jurkat und KG1a 24 h mit den Partikeln AM-NSCT-PM0-20 inkubiert und im FACS die Fluoreszenzintensität bestimmt (Abbildung 37). Bei HeLa-Zellen zeigen die Partikel AM-NSC-PM0-5 eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität, ähnlich wie der ungeladene Partikel AM-NSC-PM0. Erst bei AM-NSC-PM10 mit 0,31 Aminogruppen/nm^2 ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten, der sich bei AM-NSC-PM20 verdreifacht hat (Abbildung 37 A). MSCs zeigen nach Inkubation mit Partikel AM-NSC-PM1-10 eine sehr geringe Fluoreszenzintensität, die bei Partikel AM-NCS-PM15 (0,52 Aminogruppen/nm^2) stark ansteigt und den höchsten Wert erreicht, um dann bei Partikel AM-NSC-PM20 (0,7 Aminogruppen/nm^2) wieder leicht abzufallen (Abbildung 37 B). Auch bei Jurkat- (Abbildung 37 C) und KG1a-Zellen (Abbildung 37 D) ist das gemessene Fluoreszenzintensitätsmuster ähnlich wie bei MSCs. Bei Jurkat-Zellen wurde jedoch bei AM-NSC-PM15 eine etwas niedere Fluoreszenzintensität gemessen als bei Partikel AM-NSC-PM20.

Die Korrelation der gemessenen Fluoreszenzintensität mit zunehmender Oberflächenladung ab Partikel AM-NSC-PM10 oder Partikel AM-NSC-PM15 bis AM-NSC-PM20 verdeutlicht den positiven Einfluss der Oberflächenladung ab 0,31 bzw. 0,52 Aminogruppen/nm^2 auf die Partikelaufnahme. Es scheint also möglich zu sein, die Partikelaufnahme in verschiedene Zelllinien durch Variation der Oberflächenladung (Aminogruppen) der Partikel zu regulieren. Die leichte Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität hinsichtlich Partikel AM-NCS-PM20 mit 0,7 Aminogruppen/nm^2 bei MSCs und KG1a-Zellen könnte ähnlich wie bei HF 11 (0,61 Aminogruppen/nm^2) zu erklären sein. Die hohe Anzahl an Aminogruppen auf der Partikeloberfläche könnte zu Beeinträchtigung der Internalisation der Partikel in die Zellen durch die Ausbildung von Knäuelstrukturen und Aggregatbildung der Aminogruppen auf der Partikeloberfläche führen. Auch die Anlagerung extrazellulärer Partikelaggregate an die Zellmembran könnte zu einem starken Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität bei den Partikeln mit einer hohen Dichte an Aminogruppen auf der Oberfläche führen. Um die extrazelluläre/intrazelluläre Partikelverteilung genauer zu charakterisieren, wurde eine CLSM-Analyse durchgeführt.

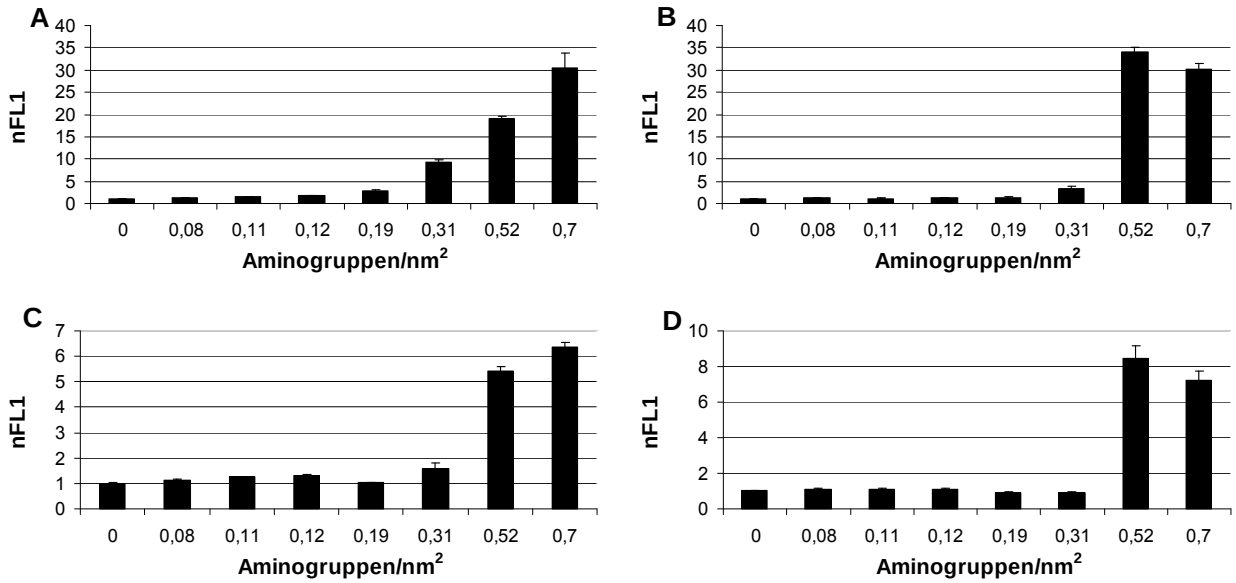


Abbildung 37: FACS-Messung von HeLas (A), MSCs (B), Jurkat (C) und KG1a (D) nach 24 h Inkubation mit den aminofunktionalisierten Partikeln AM-NSCT-PM0-20. Die Partikel sind nach steigender Anzahl an Aminogruppen/nm^2 angeordnet.

5.3.2.2 Lokalisation mittels CLSM

Zur Untersuchung des Verteilungsmusters der aminogruppenfunktionalisierten Partikel in den Zellen wurde eine CLSM-Analyse durchgeführt. Auch die Anwesenheit extrazellulärer Partikelaggregate sollte mittels CLSM-Analyse überprüft werden. HeLa-Zellen, MSCs, Jurkat-und KG1a-Zellen wurden 24 h mit den aminogruppenfunktionalisierten Polystyrolpartikeln AM-NSC-PM3, AM-NSC-PM15 und AM-NSC-PM20 inkubiert und anschließend unter dem CLSM betrachtet (siehe Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Zur Visualisierung der Zellen wurde die Zellmembran mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff RH414 angefärbt.

Die Negativkontrolle zeigt bei allen untersuchten Zelllinien keine grünen Fluoreszenzsignale (Abbildung 38 A, Abbildung 39 A, Abbildung 40 A und Abbildung 41 A).

Die Partikel AM-NSC-PM 3 sind in HeLa-Zellen fast ausschließlich intrazellulär in kleinen und hin und wieder auch größeren Clustern vorzufinden (Abbildung 38 B). Bei der Markierung von HeLa-Zellen mit Partikel AM-NSC-PM15 und 20 sind neben vielen grünen intrazellulären Fluoreszenzsignalen auch intensivere gelbe Signale zu erkennen (Abbildung 38 C und D). Dabei handelt es sich um extrazelluläre

Partikelaggregate an der Zellmembran. Das gelbe Fluoreszenzsignal entsteht durch Überlagerung des roten Fluoreszenzfarbstoffes mit den grün fluoreszierenden Partikeln. Im Zellkern konnten keine grünen Fluoreszenzsignale gefunden werden.
Bei den Partikeln AM-NSC-3 sind bei MSCs nur sehr wenig intrazelluläre grüne Fluoreszenzsignale zu beobachten. Extrazelluläre grüne Fluoreszenzsignale sind nicht zu erkennen (Abbildung 39 B). Nach Inkubation mit den Partikeln AM-NSC-15 (Abbildung 39 C) und -20 (Abbildung 39 D) sind zwar viele intrazelluläre grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen, die meisten Signale befinden sich jedoch extrazellulär an der Zellmembran und dürften Partikelaggregate darstellen. Die Partikel fluoreszieren außerdem so stark, dass nicht in allen Ebenen Aufnahmen gemacht werden konnten, da ein „overrange“ im grünen Kanal dies verhinderte.
Bei Jurkat-Zellen sind grüne Fluoreszenzsignale überwiegend intrazellulär in kleinen und in einigen Fällen auch größeren Bereichen vorzufinden (Abbildung 40 B, C und D). Bei den Partikeln AM-NSC-15 und 20 (Abbildung 40 C und D) sind auch einige Fluoreszenzsignale extrazellulär an der Zellmembran zu erkennen.
Die Partikel AM-NSC-PM 3 sind in KG1a-Zellen überwiegend intrazellulär in kleinen und hin und wieder auch größeren Clustern vorzufinden (Abbildung 41 B). Grüne Fluoreszenzsignale sind kaum an der Zellmembran lokalisiert. Bei Markierung von KG1a-Zellen mit Partikel AM-NSC-PM15 und -20 sind sehr viele extrazelluläre Fluoreszenzsignale an der Zellmembran zu finden (Abbildung 41 C und D), die auf Partikelaggregate hinweisen. Es sind fast keine intrazellulär lokalisierten Partikel vorhanden.
Die CLSM-Analyse bestätigt das Ergebnis der FACS-Analyse. Der bei der FACS-Analyse gemessene Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Partikeln mit einer hohen Dichte an Aminogruppen auf der Oberfläche beruht bei Jurkat- und KG1a-Zellen auf der hohen Partikelaggregation und starken Anhaftung dieser Aggregate an die Zellmembran. Bei HeLa-Zellen und MSCs kommt die hohe gemessene Fluoreszenzintensität im FACS bei Partikeln mit einer hohen Anzahl an Aminogruppen auf der Partikeloberfläche sowohl durch eine Zunahme intrazellulärer Partikel als auch durch die Anlagerung extrazellulärer Partikelaggregate an die Zellmembran zustande. Die größeren und kleineren intrazellulären Fluoreszenssignale könnten Partikelaggregate (für HF-Partikel gezeigt, siehe 5.3.1.1.3) oder einzelne Partikel in Endosomen darstellen (für Polyisoprenpartikel gezeigt, siehe 5.7.5). Um dies genauer zu untersuchen, wurde TEM-Analyse durchgeführt.

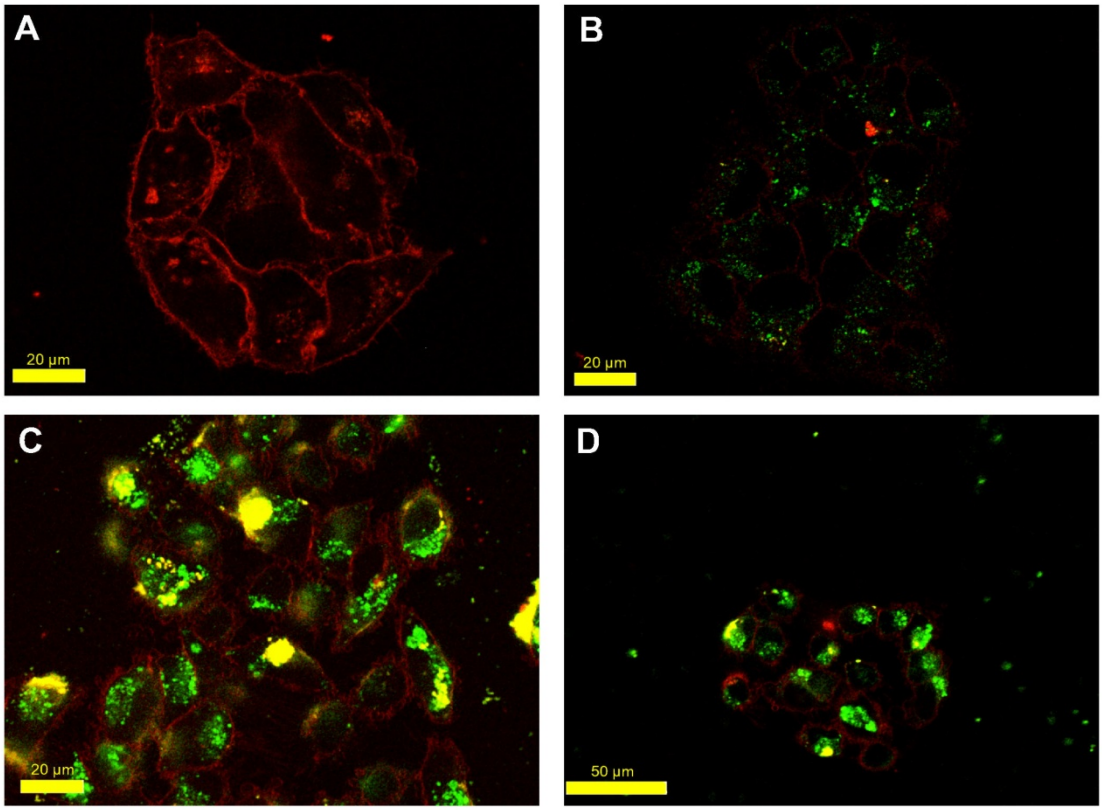


Abbildung 38: CLSM-Analyse von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit aminogruppen-funktionalisierten Polystyrolnanoartikeln AM-NSC-PM. (A) Negativkontrolle, (B) AM-NSC-PM3, (C) AM-NSC-PM15 und (D) AM-NSC-PM20.

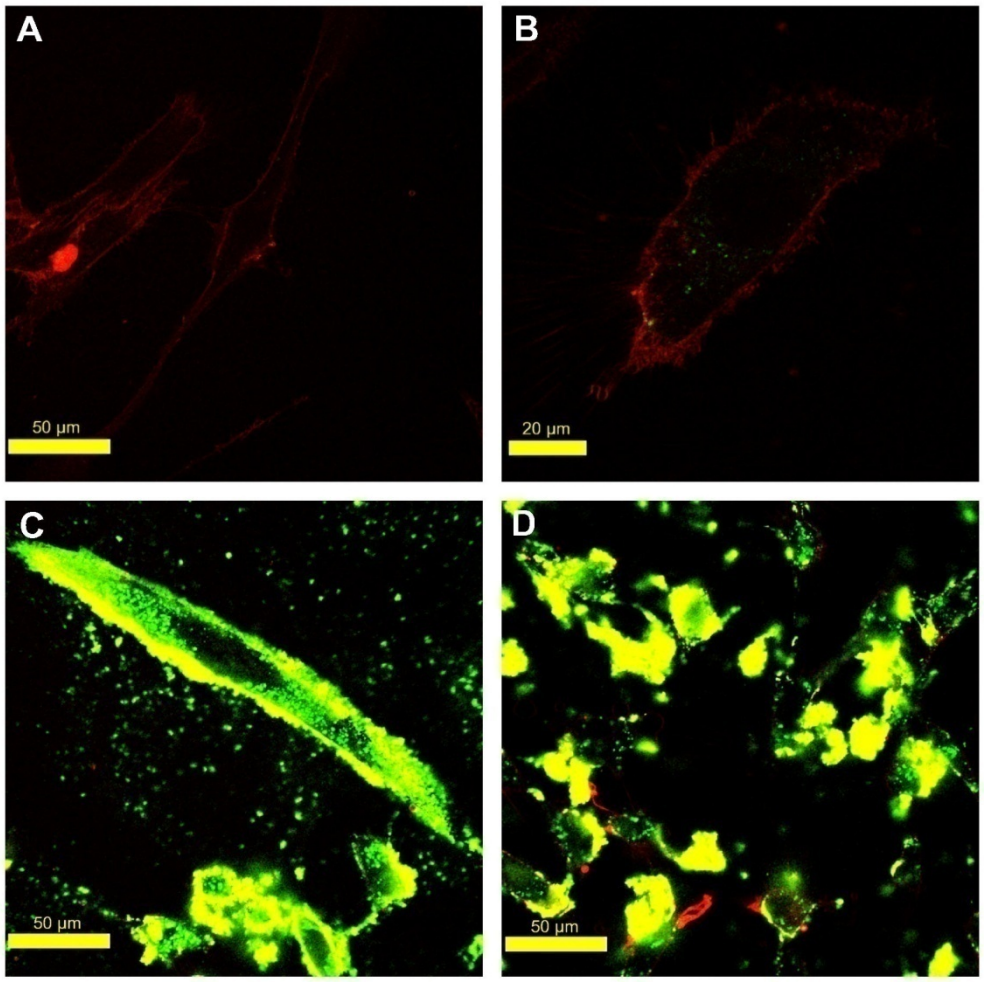


Abbildung 39: CLSM-Abbildung von MSCs nach 24 h Inkubation mit den aminogruppen-funktionalisierten Partikeln AM-NSC-PM. (A) Negativkontrolle, (B) AM-NSC-PM3, (C) AM-NSC-PM15 und (D) AM-NSC-PM20.

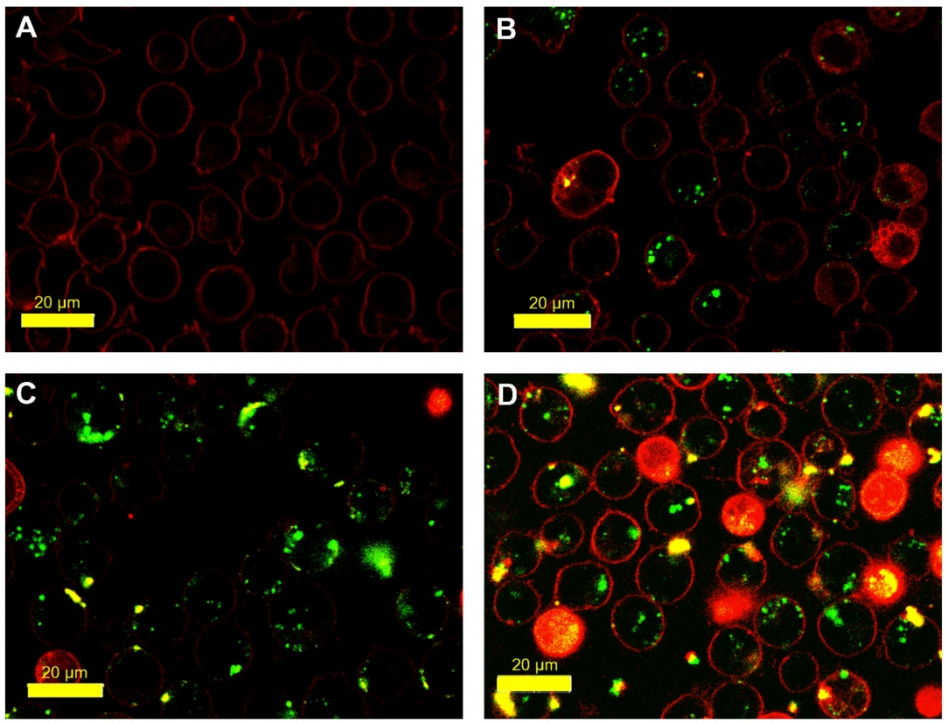


Abbildung 40: CLSM-Analyse von Jurkat-Zellen nach Inkubation mit den aminogruppen-funktionalisierten Polymerpartikeln AM-NSC-PM. (A) Negativkontrolle, (B) AM-NSC-PM3, (C) AM-NSC-PM15 und (D) AM-NSC-PM20.

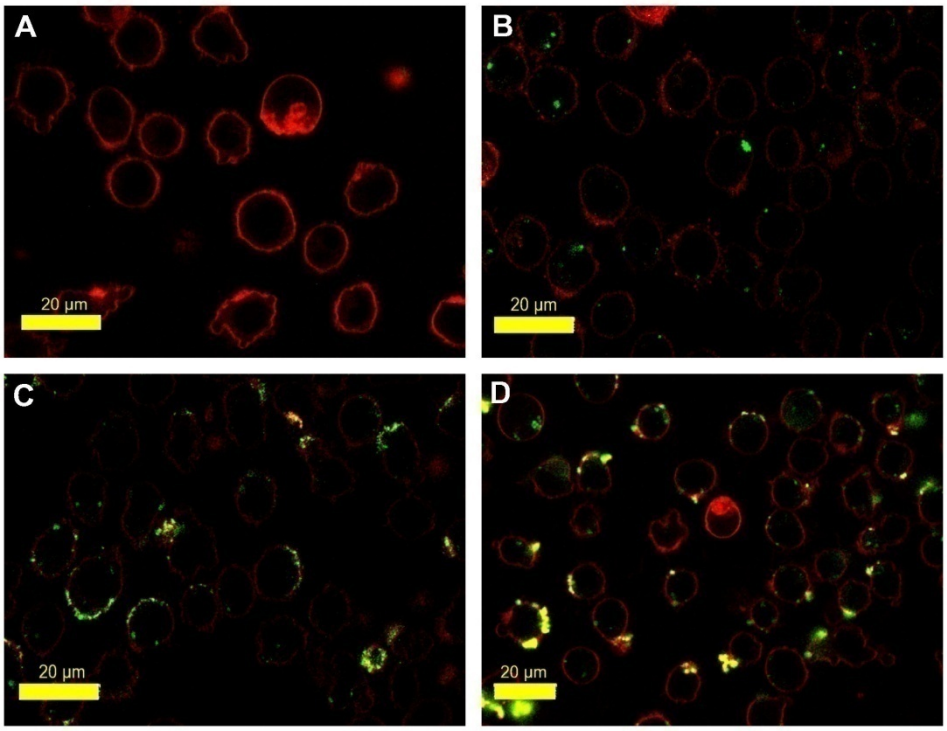


Abbildung 41: CLSM-Abbildungen von KG1a-Zellen nach 24 h Inkubation mit den Polymerpartikeln AM-NSC-PM. (A) Negativkontrolle, (B) AM-NSC-PM3, (C) AM-NSC-PM15 und (D) AM-NSC-PM20.

5.3.2.3 Lokalisation mittels TEM

Um die Verteilung einzelner Partikel oder Partikelcluster in den Zellen genauer zu untersuchen, wurde TEM-Analyse mit MSCs und Jurkat-Zellen durchgeführt. MSCs wurden 24 h mit dem Partikel AM-NSC-PM15 inkubiert. TEM-Abbildungen zeigen meist sehr viele Partikel in Zellorganellen im Zytoplasma von MSCs (Abbildung 42 A und B). Es sind auch einzelne Partikel oder kleine Partikelgrüppchen von 2 oder mehr Partikeln membranumhüllt im Zytoplasma anzutreffen (Abbildung 42 A).
Auch bei Jurkat-Zellen konnte unter dem TEM nach 24 h Inkubation mit Partikel AM-NSC-PM20 Partikelaufnahme in die Zelle beobachtet werden (Abbildung 43 A und B). Dabei werden unter anderem einzelne Partikel und kleine Partikelgrüppchen von der Zellmembran umschlossen. Die Partikelaufnahme scheint durch Einstülpung der Zellmembran zu erfolgen. Als mögliche Aufnahmemechanismen könnten die Clathrin-vermittelte Endozytose oder die Aufnahme mittels Caveolae-Vesikel in Betracht kommen. Im Zytoplasma befinden sich aber auch Zellorganellen, die mehrere Partikel beinhalten. Diese könnten durch die Fusion mehrerer kleinerer Zellorganellen intrazellulär oder durch Aufnahme von Partikelclustern entstanden sein. Bei der Aufnahme größere Partikelcluster von µm-Durchmesser könnte die Makropinozytose eine Rolle spielen (siehe Kapitel 5.3.1.1.3). Im Zellkern oder den Mitochondrien waren keine Partikel anzutreffen.

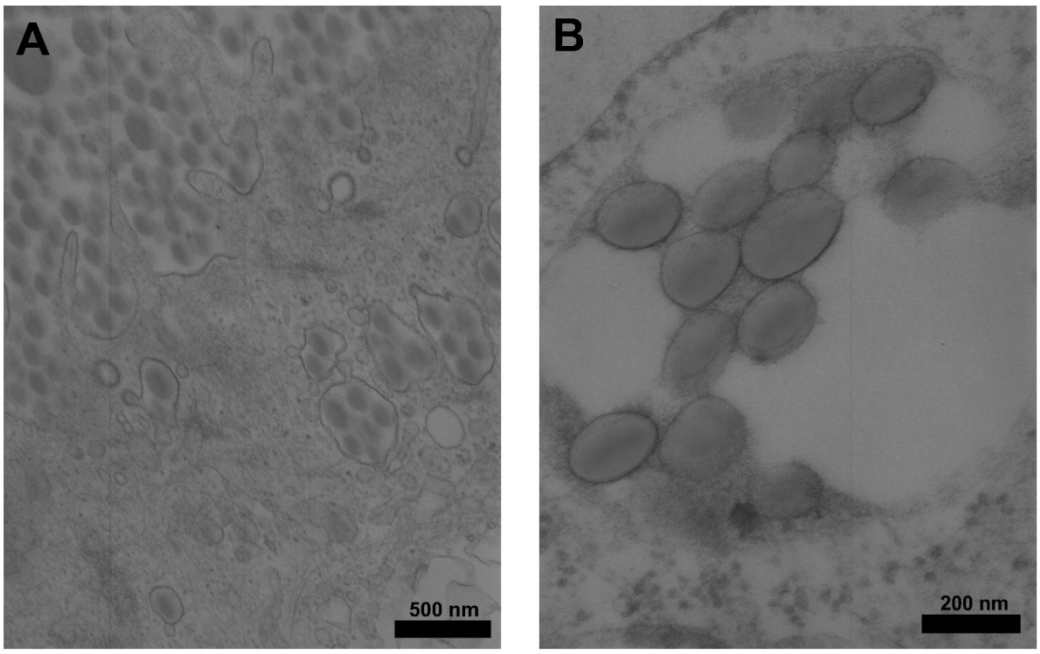


Abbildung 42: TEM-Analyse von MSCs nach 24 h Inkubation mit dem aminogruppen-funktionalisierten Polystyrolpartikel AM-NSC-PM15. (A) Extrazelluläre und intrazelluläre Partikel, (B) Partikel in einem Endosom.

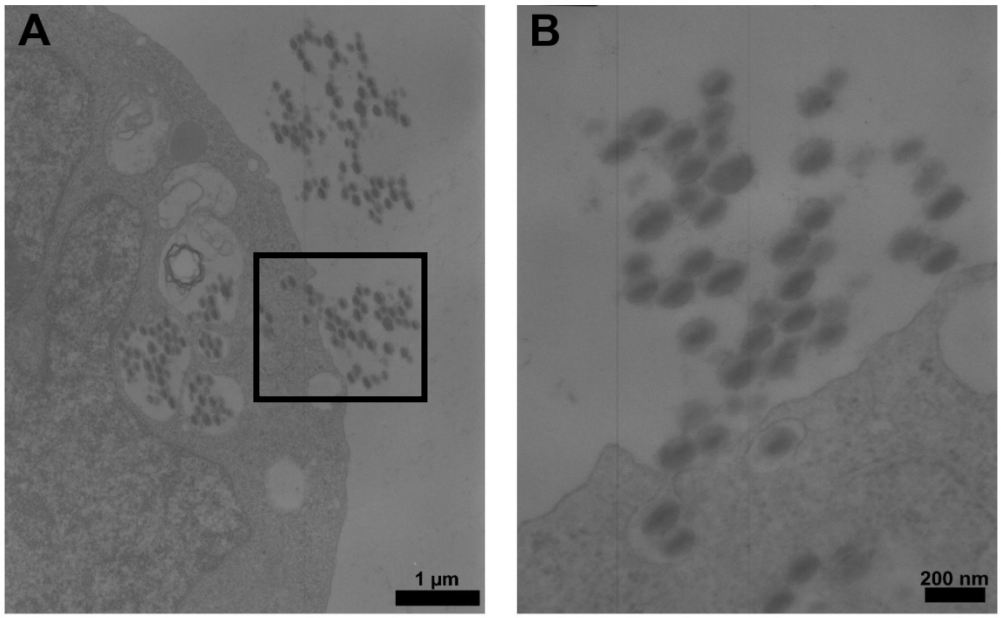


Abbildung 43: CLSM-Analyse von Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubation mit Partikel AM-NSC-PM20. (A) Partikel extrazellulär an der Zellmembran und intrazellulär in Endosomen; Partikelaufnahme, (B) Vergrößerung von A (Rechteck); Partikelaufnahme in die Zelle.

Aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass funktionalisierte Polymerpartikel mit kationischen Gruppen auf der Oberfläche die Aufnahme in Zellen auch ohne Transfektionsmittel im Gegensatz zu ungeladenen Polymerpartikeln erhöhen. Dabei kann die Partikelaufnahme über den Gehalt an geladenen Gruppen auf der Partikeloberfläche kontrolliert werden.

5.4 Aminosäurefunktionalisierte Partikel

5.4.1 Aminosäurefunktionalisierte Fluoreszenzpartikel

Nachdem es gelungen war, verschiedene Zelllinien erfolgreich mit Nanopartikeln mit einer positiven oder negativen Oberflächenladung ohne den Einsatz eines Transfektionsmittels zu transfizieren, wurden nun Aminosäuregruppen (Glycin, Glutamin, Asparagin und Lysin) mit positiver und negativer Ladung an die Oberfläche von Polystyrolnanopartikeln über EDC-Kopplung gebunden (siehe Tabelle 6) und die Aufnahme dieser derart funktionalisierter Nanopartikel in verschiedene Zelllinien charakterisiert. Anders als bei den Transfektionsmitteln, die nur adsorptiv an die Partikel binden und daher auch leicht einer Desorption zugänglich sind, sind die Aminosäuregruppen kovalent an die Oberfläche der Nanopartikel gebunden. Dadurch sollten die Partikel mit geladenen Gruppen funktionalisiert werden, die als integriertes Transfektionsmittel wirken. Es wurden zwei Partikelchargen (VHPM5k und VHPM3.3k) synthetisiert, die sich im Partikeldurchmesser unterschieden. Die Partikelgröße schwankt nur leicht hinsichtlich einer Partikelcharge. Während die Partikel VHPM5k einen Durchmesser von 250 bis 280 nm aufweisen, besitzen die Partikel VHPM3.3 einen Durchmesser von ungefähr 100 nm.

Tabelle 6: Aminosäurefunktionalisierte Polystyrolnanopartikel.

Probenname	Oberflächenfunktionalisierung	Partikelgröße [nm]
VHPM5k-Gly	Glycin	287
VHPM5k-Lys	Lysin	n.d.
VHPM5k-Glu	Glutamin	251
VHPM5k-Asp	Asparagin	260
VHPM3.3-Gly	Glycin	101
VHPM3.3-Lys	Lysin	134
VHPM3.3-Glu	Glutamin	101
VHPM3.3-Asp	Asparagin	105
AMP100	-	205
AM-SC-PM0	-	110

5.4.1.1 Fluoreszenzmessungen am FACS

Um die relative Fluoreszenzintensität und damit auch die relative Menge an intrazellulären oder an die Zellmembran angelagerten Nanopartikeln bestimmen zu können, wurde auch hier der fluoreszierende Farbstoff PMI in Partikel mit eingebaut. Es wurden MSCs, HeLa- und Jurkat-Zellen untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation der Polymerpartikel, auf deren Oberfläche Lysin-, Asparagin-Glutamin- oder Glycin-Gruppen kovalent gebunden wurden, wurde im FACS in allen untersuchten Zelllinien im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität gemessen (siehe Abbildung 44). Die Partikel AMP100 und AM-SC-PM0 besitzen keine Oberflächenladung und wurden als Kontrollpartikel mit unterschiedlichen Größen eingesetzt (siehe Tabelle 6). Bei MSCs wurden die Partikel VHPM5k und die Partikelcharge VHPM3.3k untersucht. Die Negativkontrolle und AM-SC-PM0 zeigen die geringste Fluoreszenzintensität, während bei den aminosäurefunktionalisierten Partikel eine um ein Vielfaches erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Bei den Partikeln VH-PM-3.3, die mit Lysin funktionalisiert sind, wurde eine etwas niedrigere Fluoreszenzintensität bei MSCs gemessen (Abbildung 44 B). Dies konnte mittels CLSM-Analyse bestätigt werden (Abbildung 45 E). Bei den Partikeln VHPM3.3k ist die gemessene Fluoreszenzintensität bei den anderen funktionalisierten Partikeln ähnlich (Abbildung 44 B). Bei HeLa- Zellen (Abbildung 44 A) zeigt der Kontrollpartikel AMP100 die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von Partikel VHPM5k-Lys, während bei MSCs (Abbildung 44 C) sowie Jurkat-Zellen (Abbildung 44 D) Partikel VHPM5k-Lys, der Lysingruppen auf der Oberfläche trägt, eine etwas höhere Fluoreszenzintensität als die anderen funktionalisierten Partikel zeigt. Bei Jurkat-Zellen besitzt der Kontrollpartikel eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität wie die anderen funktionalisierten Partikel. Es blieb unklar, weshalb der ungeladene Kontrollpartikel bei HeLa- und Jurkat-Zellen eine derart hohe Fluoreszenzintensität zeigte. Die Ergebnisse geben jedoch den Eindruck, dass die gemessene Fluoreszenzintensität von der Funktionalisierung der Nanopartikel abhängt. So zeigt der Partikel VH-PM-5k, der Lysin-Gruppen auf der Oberfläche trägt (VH-PM-5k-Lys), im Vergleich zu den anderen funktionalisierten Partikeln VHPM5k bei allen Zelllinien eine um etwa 25% erhöhte Fluoreszenzintensität (Abbildung 44 A, C und D). Eine Erklärung für die erhöhte Fluoreszenzintensität bei allen Zelllinien nach Inkubation mit Lysin-funktionalisierten Partikeln kann auf die positive Oberflächenladung zurückgeführt werden. Die meisten Transfektionsmittel sind positiv geladene Moleküle, wie auch das polymere Transfektionsmittel Poly-L-Lysin (PLL). Bei den Partikeln mit Glycin, Glutamin und Asparagin zeigt sich bei allen Zelllinien ein ähnliches Fluoreszenzintensitätsmuster. Der Partikeldurchmesser

scheint die Zellaufnahme zu beeinflussen. So zeigen die funktionalisierten Partikel VH-PM-3.3 mit einem Durchmesser von ca. 100 nm eine höhere gemessene Fluoreszenzintensität als die Partikel VH-PM-5k mit einem Durchmesser von ca. 260 nm.

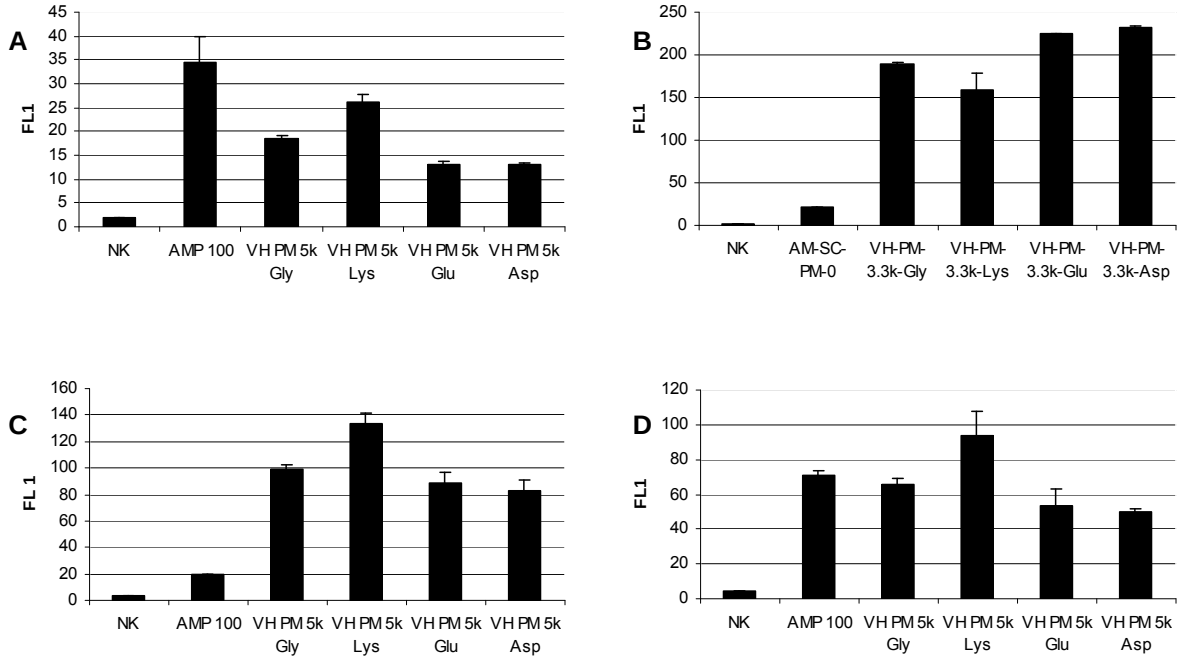


Abbildung 44: FACS-Analyse von HeLa (A), MSCs (B VHPM3.3, C VHPM5k) und Jurkat (D) nach 24 stündiger Inkubation mit aminosäurefunktionalisierten Partikeln.

5.4.1.2 Lokalisation mittels CLSM

Um die Nanopartikel in der Zelle besser lokalisieren sowie zwischen intra- und extrazellulären Partikeln unterscheiden zu können, wurden CLSM-Untersuchungen durchgeführt. Die Zellmembran wurde mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff zur Visualisierung der Zellen angefärbt. CLSM von MSC und Jurkat-Zellen zeigt nach 24 h grüne Fluoreszenzsignale in den Zellen, die auf eine Partikelaufnahme in die Zellen hindeuten (Abbildung 45 und Abbildung 46 MSCs und Abbildung 47 Jurkats). Es gibt jedoch zwischen HeLa- und Jurkat-Zellen signifikante Unterschiede. Bei MSCs sind im Zytoplasma bedeutend mehr und auch intensivere grüne Fluoreszenzsignale zu finden als bei Jurkat-Zellen, was auf eine erhöhte intrazelluläre Partikelaufnahme hinweist. Bei der Negativkontrolle sind keine grünen Fluoreszenzsignale zu sehen (Abbildung 45, Abbildung 46 und Abbildung 47 A). Zellen, die mit Partikeln ohne

Oberflächenladung inkubiert wurden, zeigen nur eine sehr geringe Grünfluoreszenz im Zytoplasma (siehe Abbildung 45 B). Es ist bei allen Zelllinien keine extrazelluläre Anlagerung der Partikel in der Zellmembran zu finden. Im Zellkern werden keine fluoreszierenden Nanopartikel detektiert. Die aminosäurefunktionalisierten Partikel VH-PM3.3 zeigen hinsichtlich Signalintensität im Zytoplasma von MSCs keine Unterschiede zwischen Asparagin-, Glutamin-, Lysin- und Glycin-Funktionalisierung (siehe Abbildung 45 C, D, E und F). Bei Jurkat-Zellen zeigen mit Glutamin funktionalisierte Partikel jedoch eine etwas stärkere Grünfluoreszenz als mit Asparagin funktionalisierte Partikel (siehe Abbildung 47 C versus B). Bei den aminosäurefunktionalisierten Partikeln VH-PM5k ist im Zytoplasma von MSCs hinsichtlich Asparagin-, Lysin- und Glutamin-Funktionalisierung eine ähnlich starke Grünfluoreszenz der Partikel zu erkennen (siehe Abbildung 47 B, C und D). Damit werden die FACS-Ergebnisse, die für Lysin-funktionalisierte Partikel eine etwas höhere Fluoreszenzintensität ergaben (siehe Abbildung 44 C), hier zwar nicht direkt bestätigt, aber es ist sehr wahrscheinlich, dass der eher geringe Unterschied der höheren Fluoreszenzintensität zwischen Lysin-funktionalisierten Partikeln und den anderen funktionalisierten Partikeln im CLSM visuell nicht zu erkennen ist. Bei Jurkat-Zellen bestehen bei Asparagin-, Glutamin- und Glycin-funktionalisierten Partikeln keine Unterschiede in der intrazellulären Signalintensität der grün fluoreszierenden Partikel (siehe Abbildung 47 D, E und F). Die Partikelaufnahme in die Zellen scheint zum einen von der jeweiligen Zelllinie abzuhängen. Wie bei den Partikeln mit Carboxylgruppen und Aminogruppen auf der Oberfläche nehmen adhärente Zelllinien wie MSCs die Partikel besser auf als die Suspensionszelllinie Jurkat. Zum anderen beeinflussen Eigenschaften der Partikel oder Substanzen aus der Partikeldispersion die Aufnahmerate in die Zellen. Damit kann die unterschiedlich starke Aufnahme der mit Asparagin und Glutamin funktionalisierten Partikel VH-PM3.3 und VH-PM5k in die gleiche Zelllinie (Jurkat-Zellen) erklärt werden.
Die Ergebnisse führen zu der Einsicht, dass die Partikelaufnahme in verschiedene Zelllinien durch eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit Aminosäuregruppen erhöht werden kann.

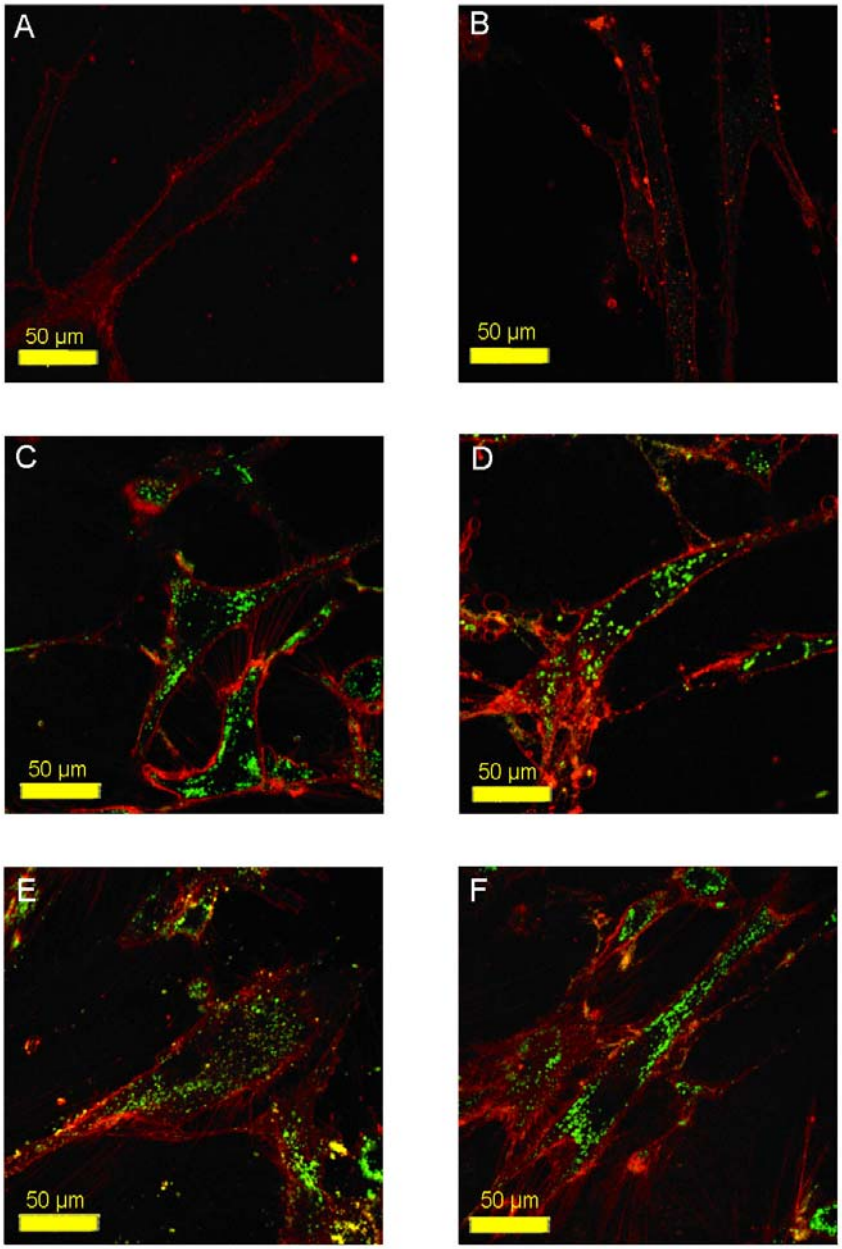


Abbildung 45: LSM-Analyse von MSCs, die mit aminosäurefunktionalisierten Partikeln VH-PM-3,3k 24 h lang inkubiert wurden. Der Fluoreszenzfarbstoff RH414 lagert sich in die Zellmembran ein (roter Kanal) und dient der Visualisierung der Zellen. Die Negativkontrolle (A) und Zellen, die mit Partikel AM-SC-PM0 ohne Oberflächenladung markiert wurden (B) zeigen keine grünfluoreszierenden Signale (grüner Kanal) der Partikel im Zytoplasma. Eine intrazelluläre Aufnahme der Partikel ist bei Partikeln mit Aminosäuregruppen auf der Oberfläche zu erkennen (C: VH-PM3.3-Asp, D: VH-PM3.3-Glu, E: VH-PM3.3-Lys, F: VH-PM3.3Gly)

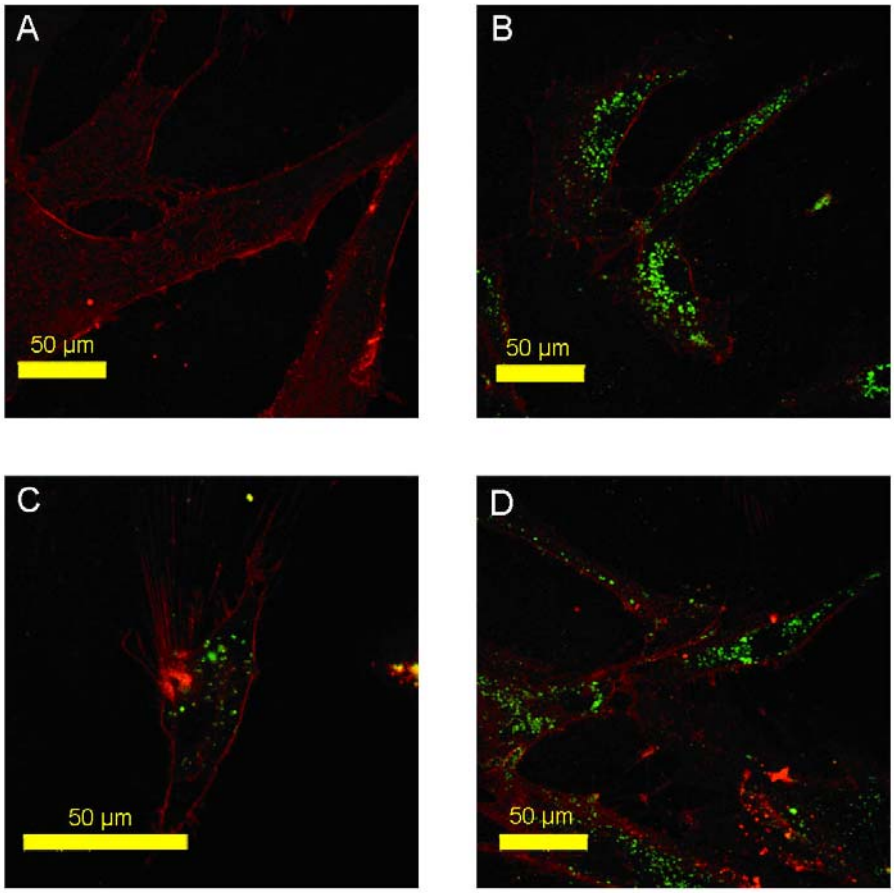


Abbildung 46: LSM-Analyse von MSCs nach 24 stündiger Inkubation mit den aminosäure-funktionalisierten Partikeln VH-PM-5k. Bei (B) VH-PM5k-Asp, (C) VH-PM5k-Lys, (D) VH-PM5k-Gly sind grünfluoreszierende Signale von den Partikeln im Zytoplasma zu finden. Die Negativkontrolle (A) zeigt keine grünfluoreszierenden Signale.

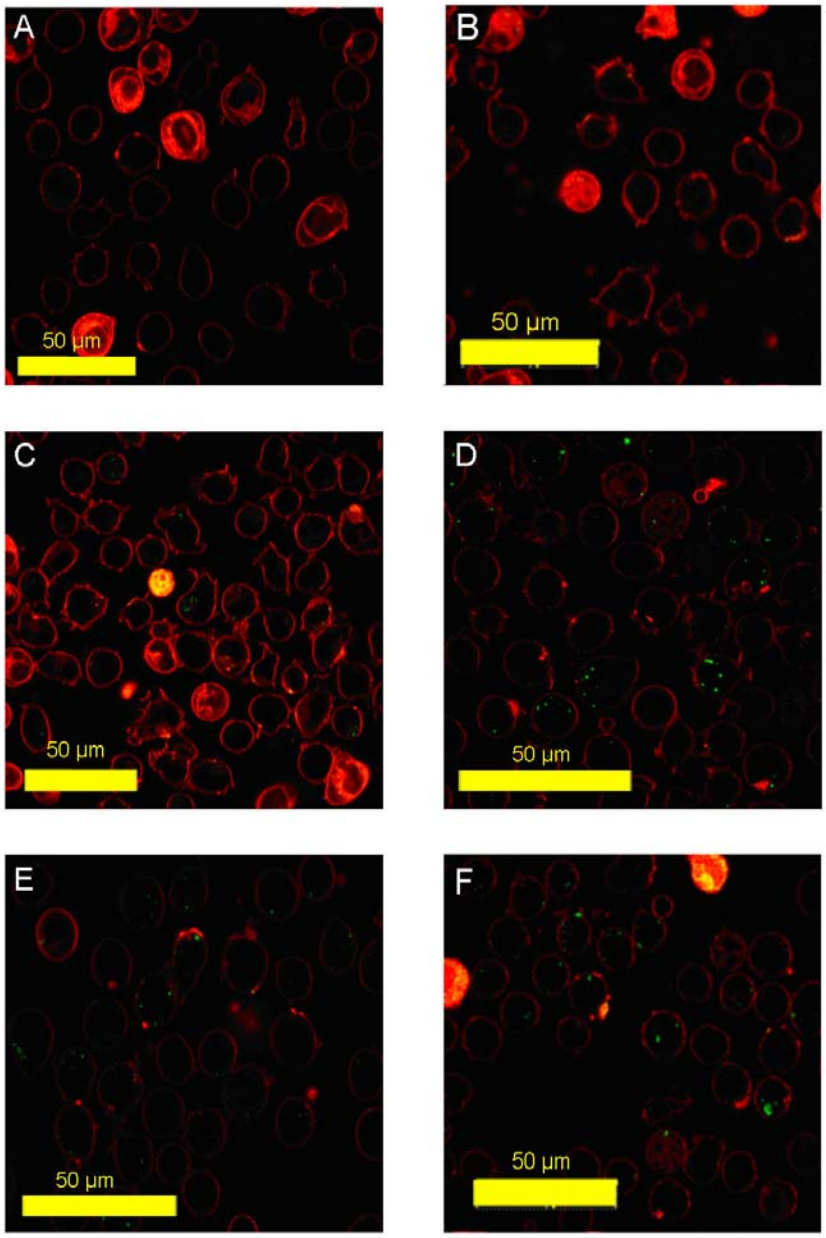


Abbildung 47: LSM von Jurkat-Zellen, die 24 h mit den aminosäurefunktionalisierten Polymerpartikeln VH-PM-3.3-Aminosäure inkubiert wurden. Es sind grün fluoreszierende Signale der Partikel in den Zellen nach Inkubation mit den aminosäurefunktionalisierten Partikeln zu erkennen (z.B.: VH-PM3,3-Asp, C: VH-PM3,3-Glu, D: VH-PM5k-Asp, E: VH-PM5k-Glu, F: VH-PM5k-Gly). Bei der Negativkontrolle sind keine grünen Fluoreszenzsignale zu erkennen (A).

5.4.2 Aminosäurefunktionalisierte Magnetitpartikel

Nachdem die Lysin-funktionalisierten Polystyrolpartikel (VHPM5kLys) die höchste Partikelaufnahme in verschiedene Zelllinien zeigten, wurden zunächst superparamagnetische Polystyrolpartikel, in denen Magnetit verkapselt vorliegt, die aber keine Oberflächenfunktionalisierung aufweisen, von Verena Holzapfel im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für organische Chemie III an der Universität Ulm synthetisiert [224]. Sie besaßen einen Partikeldurchmesser von ungefähr 70 nm (Tabelle 7). Diese superparamagnetischen Magnetitpartikel wurden anschließend funktionalisiert, indem auf deren Oberfläche mittels EDC-Kopplung Lysin-Gruppen kovalent angebunden wurden (Tabelle 7). Nach der Kopplung hatte sich der Partikeldurchmesser mehr als verdoppelt. Die Aufnahme in HeLa-Zellen und MSCs oberflächenfunktionalisierter Partikel konnte so direkt mit der Aufnahme von Partikeln ohne Oberflächenfunktionalisierung verglichen werden.

Tabelle 7: Unfunktionalisierte und Lysin-funktionalisierte Eisenoxidnanopartikel.

Probenname	Oberflächenfunktionalisierung	Partikeldurchmesser [nm]
VH3ka	-	68
VH3kaLys	Lysin	151

5.4.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen funktionalisierter Eisenoxidnanopartikel

HeLa-Zellen wurden mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln ohne Funktionalisierung (VH3ka) und mit Eisenoxidpartikeln mit Lysin-Gruppen (VH3kaLys) auf der Oberfläche 24 h inkubiert. Bei den Partikeln VH3ka musste das Transfektionsmittel PLL zugegeben werden, um die Partikelaufnahme auf ein Limit oberhalb der Nachweisgrenze zu erhöhen, während bei Lysin-funktionalisierten Partikeln auf einen Einsatz des Transfektionsmittels verzichtet werden konnte. Da die Partikel keinen Fluoreszenzfarbstoff enthielten, erfolgte eine Preußisch-Blau-Färbung, um die Partikelaufnahme in die Zellen lichtmikroskopisch verfolgen zu können (Abbildung 48). Bei den Zellen erkennt man nach Zugabe von VH3ka+PLL eine leichte Blaufärbung (Abbildung 48 B). Die Zellen erscheinen ebenso wie die der Negativkontrolle (Abbildung 48A) etwas granuliert. Bei Partikel VH3kaLys erscheint

das Zytoplasma der Zellen stark granuliert und weist eine sehr intensive Blaufärbung auf (Abbildung 48 C), die bei der Negativkontrolle (Abbildung 48 A) fehlt. Aufgrund dieser Beobachtung ist es sehr wahrscheinlich, dass die Partikel aufgenommen wurden. Partikel mit kovalent gebundenen Lysin-Gruppen auf der Oberfläche erweisen sich in dieser ersten lichtmikroskopischen Untersuchung als äußerst viel versprechend gegenüber der herkömmlichen Transfektion der Zellen mit Hilfe von PLL. Kovalent an der Partikeloberfläche gebundenes Lysin (Partikel VH3kaLys) scheint eine höhere Partikelaufnahme in HeLa-Zellen zu bewirken als unfunktionalisierte Partikel, die mit dem Transfektionsmittel PLL zusammen inkubiert werden. Um genauere Aussagen über die Lokalisation der Partikel machen zu können, wurden TEM-Analysen durchgeführt.

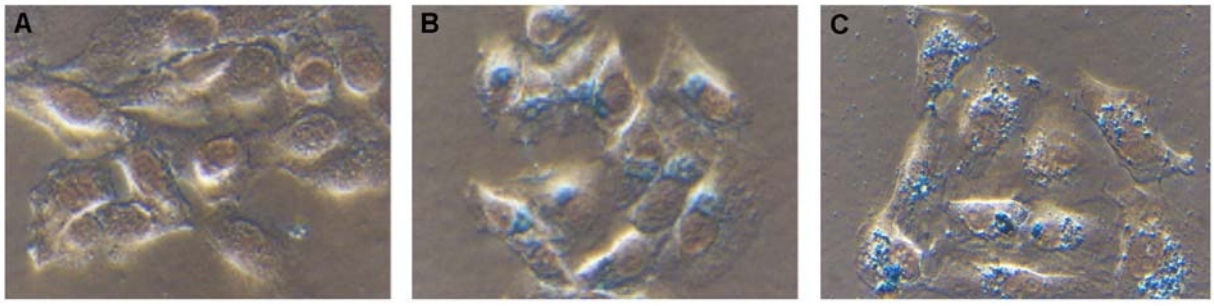


Abbildung 48: Preußisch Blau-Färbung von VH3ka und VH3kaLys in HeLa-Zellen. Die Negativkontrolle weist kleine blaue Punkte auf (A), während Zellen nach Zugabe von VH3ka und PLL blaue Bereiche zeigen (B). Nach Inkubation mit VH3kaLys ist auch ohne Zugabe eines Transfektionsmittels in den Zellen eine Blaufärbung zu erkennen (C).

5.4.2.2 Lokalisation mittels TEM

Zur TEM-Analyse wurden MSCs 24 h mit dem Kontrastmittel Resovist® 1x mit PLL, den experimentellen Partikeln VH3ka mit PLL sowie den experimentellen Partikeln VH3kaLys, an deren Oberfläche Lysingruppen kovalent angebunden wurden, inkubiert. Resovist® und das Transfektionsmittel wurden als Positivkontrolle verwendet, da bereits aus früheren Versuchen bekannt war, dass diese Kombination zu einer sehr guten Partikelaufnahme in MSCs führt (siehe Kapitel Lokalisation durch das TEM 5.1.2). Eine gute Partikelaufnahme in die Zellen konnte bei Resovist® mit PLL (Abbildung 49 A) beobachtet werden. In den MSCs befanden sich viele Partikel. Auch bei Partikel VH3ka und PLL waren Partikel in den Zellen zu finden (Abbildung 49 B), jedoch deutlich weniger. In Zellen, die mit Partikel VH3kaLys (Abbildung 49 C) behandelt wurden, sind sehr viele intrazelluläre Partikelcluster zu erkennen. Die Aufnahme von Partikel VH3ka-Lys scheint nicht geringer zu sein als die von Resovist® mit PLL und übertrifft die Aufnahme des unfunktionalisierten Partikels

VH3ka mit PLL um ein Vielfaches. Mit dem Einsatz von Partikel VH3ka-Lys ergeben sich mehrere Vorteile. Zunächst könnte auf ein toxisches und nicht für klinische Anwendungen zugelassenes Transfektionsmittel verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber Resovist® ist der, dass die superparamagnetischen Polystyrolpartikel stabil (Polystyrol verhindert die Degradierung des Magnetits) sind und daher auch für Langzeitanwendungen eingesetzt werden können. Die Abbildung 49 D zeigt die Aufnahme eines Partikelclusters (VH3ka-Lys) in die Zelle. Im Zellkern und den Mitochondrien waren keine Partikel lokalisiert. Die Partikel befinden sich in endosomenähnlichen Zellorganellen. Es sind neben den intrazellulär lokalisierten Partikeln auch extrazelluläre Partikelaggregationen zu finden (siehe Abbildung 49 A, B und D).

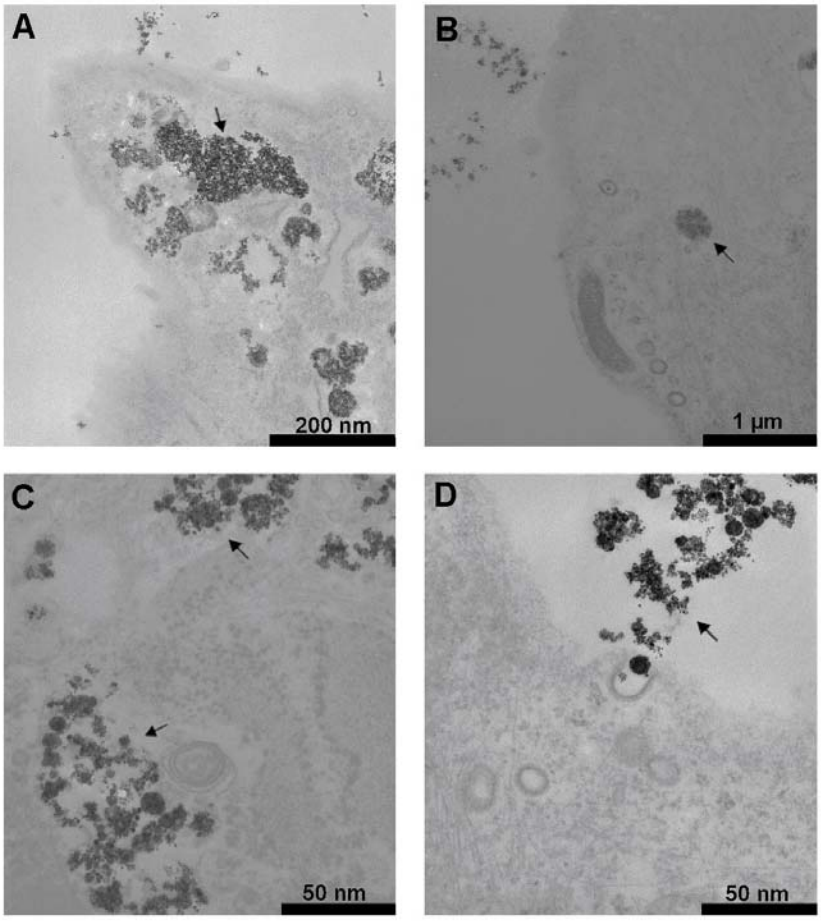


Abbildung 49: TEM-Analyse von mesenchymalen Stammzellen, die 24 h mit Partikel VH3ka und Transfektionsmittel PLL, mit dem Kontrastmittel Resovist und dem Transfektionsmittel PLL als Positivkontrolle und funktionalisiertem Partikel VH3kaLys, der Lysin-Gruppen an der Oberfläche trägt, inkubiert wurden. A: Nach Markierung mit Resovist und PLL sind viele Partikel in intrazellulären Organellen lokalisiert. B: Bei VH3ka und PLL sind nur sehr wenig Partikelcluster in den Zellen zu erkennen. C: Bei Partikel VH3kaLys befinden sich viele Partikel intrazellulär und sind in bestimmten Zellorganellen eingelagert. D: Es konnte eine Partikelaufnahme von VH3kaLys durch ein Zellorganell, das einem Endosomen ähnelt, gezeigt werden.

5.4.2.3 Quantitative Eisenmessung

Die Berliner-Blau-Färbung und die TEM-Analyse geben einen visuellen Eindruck der intrazellulären Partikelanreicherungen. Um den Eisengehalt in den Zellen zu quantifizieren, wurde ein nasschemisches Verfahren, der Ferrozin-Test durchgeführt. MSCs wurden dazu 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an VH3ka und VH3kaLys (0,1x entspricht 7,5 µg Partikel pro mL Medium, 1x entspricht 75 µg Partikel pro mL Medium) inkubiert, um so eine Korrelation zwischen der Eisenaufnahme und der Partikelkonzentration zu erhalten und einen guten Vergleich der beiden Partikel zu ermöglichen. Die Bestimmung des Eisengehaltes ergab, dass funktionalisierte Partikel, die Lysin-Gruppen an der Oberfläche tragen, im Vergleich zu Partikel VH3ka, bei dem zusätzlich als Transfektionsmittel PLL eingesetzt wurde, um ein Vielfaches besser aufgenommen werden (Abbildung 50). Damit ist der Partikel VH3ka-Lys mit seiner ca. 4-mal höheren Aufnahmerate bei 1x Konzentration gegenüber unfunktionalisierten Partikeln mit dem Transfektionsmittel PLL überlegen. Als Positivkontrolle diente das Kontrastmittel Resovist® in Verbindung mit PLL. Hier wird der höchste Eisengehalt von ca. 17 pg Eisen pro Zelle gemessen. Da das Kontrastmittel Resovist® in früheren Experimenten eine sehr starke Partikelkoagulation im Medium zeigte (siehe Kapitel Quantitative Eisenmessung 5.1.3), was Eisenbestimmungen in Zellen aufgrund des hohen extrazellulären Eisengehaltes erschwert, ist davon auszugehen, dass der hohe quantitativ gemessene Eisengehalt auch durch extrazelluläre Partikelaggregate zu stande kommt. Aus den Experimenten geht hervor, dass Partikel mit kovalent gebundenem Lysin eine effektivere Transfektion von Zellen erlauben als Partikel mit dem toxischen Transfektionsmittel Poly-L-Lysin, das an die Partikeloberfläche adsorbiert. Aufgrund des hohen Gehalts an detektiertem Eisen in den Zellen, sind die superparamagnetischen Partikel VH3ka-Lys für ein großes Einsatzgebiet im Bereich der Biomedizin geeignet, wie zum Beispiel als Kontrastmittel für die MRT, die Hyperthermie und die magnetische Zelltrennung. Die experimentellen Partikel besitzen auch Vorteile gegenüber dem Kontrastmittel Resovist®, das zwar eine gute Transfektionseffizienz aufweist, aber keine so gute Stabilität. So führt die Instabilität der Dextranhülle vermutlich zu deren Ablösung von den Magnetitpartikeln, die dadurch Reaktionen zugänglich sind und leicht abgebaut werden können. Die experimentellen Partikel hingegen sind für Langzeitanwendungen aufgrund der nicht bioabbaubaren Polymerhülle geeignet.
Ein weiterer Nachteil der kommerziellen Kontrastmittel Resovist® und Feridex© ist, dass deren Oberfläche chemisch nicht mehr modifiziert werden kann, um ihre Eigenschaften zu verändern. Außerdem können bei den superparamagnetischen

Magnetitpartikeln Oberflächenmodifikationen durchgeführt werden, wodurch die Partikel biofunktionalsiert werden können. In weiteren Synthesereihen wurden von Verena Holzapfel nun fluoreszierende superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel hergestellt. Es sollte die Zellaufnahme mit Hilfe von Partikeln mit unterschiedlicher Anzahl an negativ geladenen Carboxylgruppen auf der Oberfläche beeinflusst werden. Die Partikel besaßen neben Magnetit auch einen Fluoreszenzfarbstoff, der sie als Dualreporter auszeichnete.

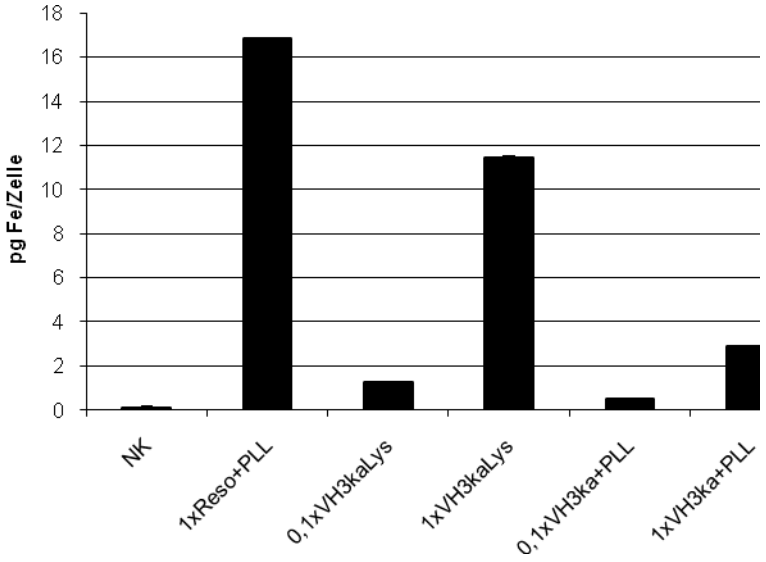


Abbildung 50: Quantifizierung des Eisengehaltes mittels Ferene-S-Methode nach 24 stündiger Inkubation von verschiedenen Konzentrationen (0,1x= 7,5 µg Partikel pro mL Medium; 1x= 75 µg Partikel pro mL Medium) an superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (VH3ka, VH3ka-Lys) mit MSCs. Als Positivkontrolle dienten das kommerzielle Kontrastmittel Resovist® mit dem Transfektionsmittel PLL.

5.5 Fluoreszierende superparamagnetische Partikel

Mittels Miniemulsionspolymerisation wurde eine Reihe superparamagnetischer Polystyrolnanopartikel mit einer homogenen Verteilung an verkapseltem Magnetit von Verena Holzapfel hergestellt. Um die Partikel für die Detektion am FACS und CLSM zuganglich zu machen, wurde der fluoreszierende Farbstoff PMI mit in die Partikel eingebaut. Durch Co-Polymerisation unterschiedlicher Acrylsäuremengen und Styrol bei der Partikelsynthese konnten Partikel mit unterschiedlichem Anteil an Carboxygruppen auf der Oberfläche hergestellt werden (siehe Tabelle 8). Der Partikeldurchmesser lagen in einem kleinen Größenbereich (zwischen 45 und 67 nm; siehe Abbildung 51). Die Nanopartikel hatten die Funktion eines Dualreporters. Es waren sowohl FACS-Messungen für histologische Fragestellungen als auch MRT-Messungen aufgrund der superparamagnetischen Eigenschaften möglich.
Die Aufnahme der funktionalisierten Partikel in unterschiedliche Zelllinien wurde mittels FACS, CLSM und Ferene-S-Methode charakterisiert.

Tabelle 8: Übersicht verschiedener fluoreszierender superparamagnetischer Eisenoxid-nanopartikel, nach steigendem Gehalt an Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche angeordnet.

Partikelbezeichnung	Anteil Acrylsäure im Monomer [%]	COO^--Gruppen pro Partikel	COO^--Gruppen pro nm^2	Partikeldurchmesser [nm]
vhmpm0	0	542	0,08	57
vhmpm1	2	1129	0,11	53
vhmpm2	2	691	0,11	45
vhmpm5	5	1804	0,31	52
vhmpm10	10	6408	0,85	46
vhmpm15	15	23452	1,52	67

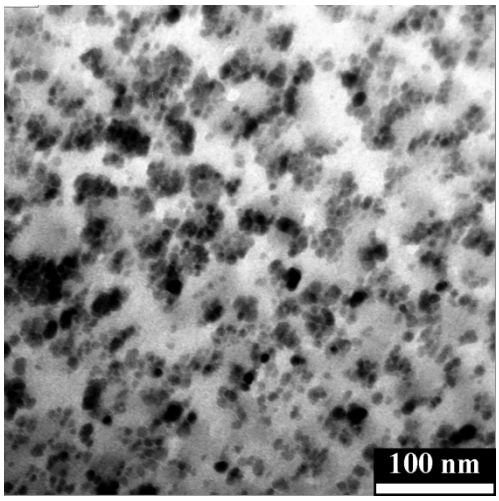


Abbildung 51: TEM-Bild von verkapselten Magnetitpartikeln mit 1% Acrylsäure (VHMPM1).

5.5.1 Fluoreszenzmessungen am FACS

FACS-Analysen wurden mit HeLa-Zellen (Abbildung 52 A) und MSCs (Abbildung 52 B) nach 24 h Inkubation mit den fluoreszierenden superparamagnetischen Partikeln VHMPM 0-15 durchgeführt. Um die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen vergleichen zu können, wurde die gemessene Fluoreszenzintensität normalisiert (siehe Kapitel 4.2). FACS-Messungen ergaben die höchsten gemessenen Werte der relativen Fluoreszenzintensität bei VHMPM 5, 10 und 15 bei allen untersuchten Zelllinien. Die Werte der Fluoreszenzmessung bei Jurkat- (Abbildung 52 C) und KG1a-Zellen (Abbildung 52 D) ähneln denen von HeLa-Zellen (Abbildung 52 A). Die gemessene Fluoreszenzintensität nimmt hier von ungeladenen bis schwach geladenen Partikeln (VHMPM0, VHMPM1 und VHMPM2) bis zu Partikeln mit steigendem Gehalt an Carboxyl-Gruppen auf der Partikeloberfläche (VHMPM5, Partikel VHMPM10 bis Partikel VHMPM15) leicht zu. Auch bei MSCs ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von ungeladenen bis schwach geladenen Partikeln (VHMPM0, VHMPM1 und VHMPM2) bis zu den Partikeln mit einer höheren Anzahl an Carboxygruppen auf der Oberfläche (von Partikel VHMPM5 bis VHMPM15) zu erkennen, während Partikel VHMPM10 eine etwas schwächere Fluoreszenzintensität zeigt (Abbildung 52 B). Da die Partikel einen ähnlichen Durchmesser aufweisen, dürfte die Oberflächenladung der Partikel den wesentlichen Parameter für die zunehmende Partikelaufnahme von Partikel VHMPM0 bis Partikel VHMPM15 darstellen. Dieser Einfluss der Oberflächenladung wurde bereits in früheren Experimenten beschrieben (siehe Kapitel 5.2 Partikel mit COOH-Gruppen auf der Oberfläche).

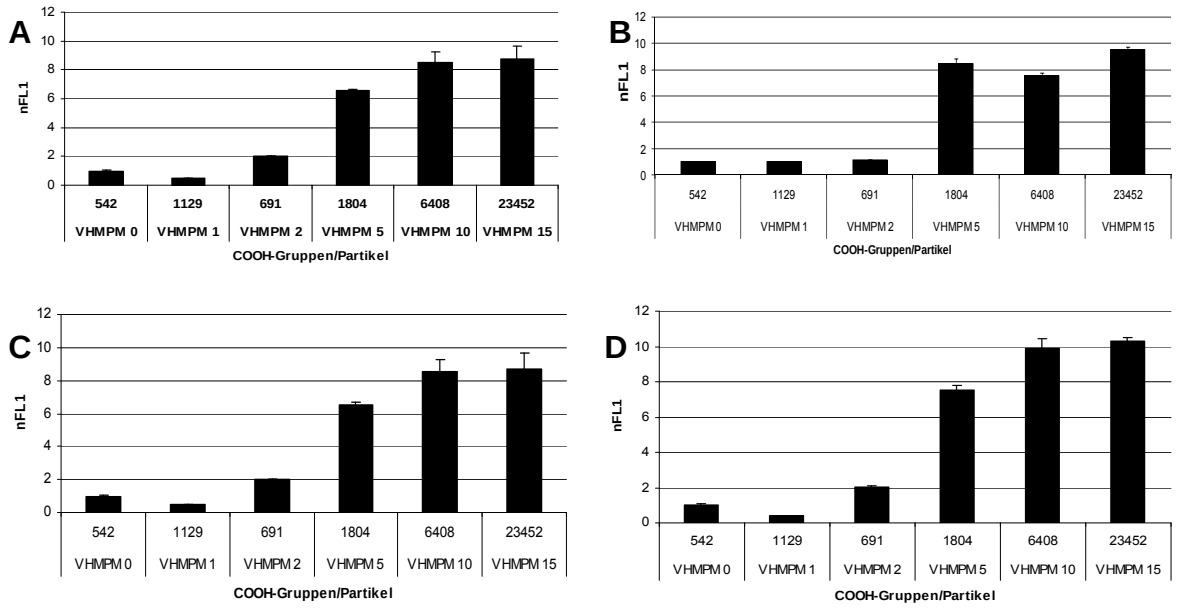


Abbildung 52: Aufnahme von VHMPM-Partikeln in verschiedene Zelllinien HeLa (A), MSC (B), Jurkat (C), KG1a (D). Unterschiedliche Zelllinien zeigen im FACS ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Oberflächenladung der Partikel korreliert mit der gemessenen Fluoreszenzintensität.

5.5.2 Lokalisation mittels CLSM

Aufgrund des Dual-Reporter-Charakters (neben Magnetit) der Partikel können sie aufgrund ihres Fluoreszenzfarbstoffes nach Aufnahmeexperimenten in Zellen am CLSM detektiert werden. CLSM-Analyse wurde mit HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit den fluoreszierenden magnetischen Partikeln VHMPM 2, 5, und 10 durchgeführt. Die Negativkontrolle, die nicht mit Partikeln inkubiert wurde, zeigt keine grünen Fluoreszenzsignale (Abbildung 62 A). Bei Zellen, die mit Partikel VHMPM 2 inkubiert wurden, sind ebenfalls kaum grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen (Abbildung 62 B), während bei Zellen, die mit Partikel VHMPM 5 (Abbildung 62 C) und VHMPM 10 (Abbildung 62 D) inkubiert wurden, sehr viele intrazelluläre grüne Fluoreszenzsignale zu sehen sind. Die CLSM-Daten stimmen somit gut mit den FACS-Ergebnissen überein. Die Partikelaufnahme korreliert damit positiv mit der Anzahl der Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche.

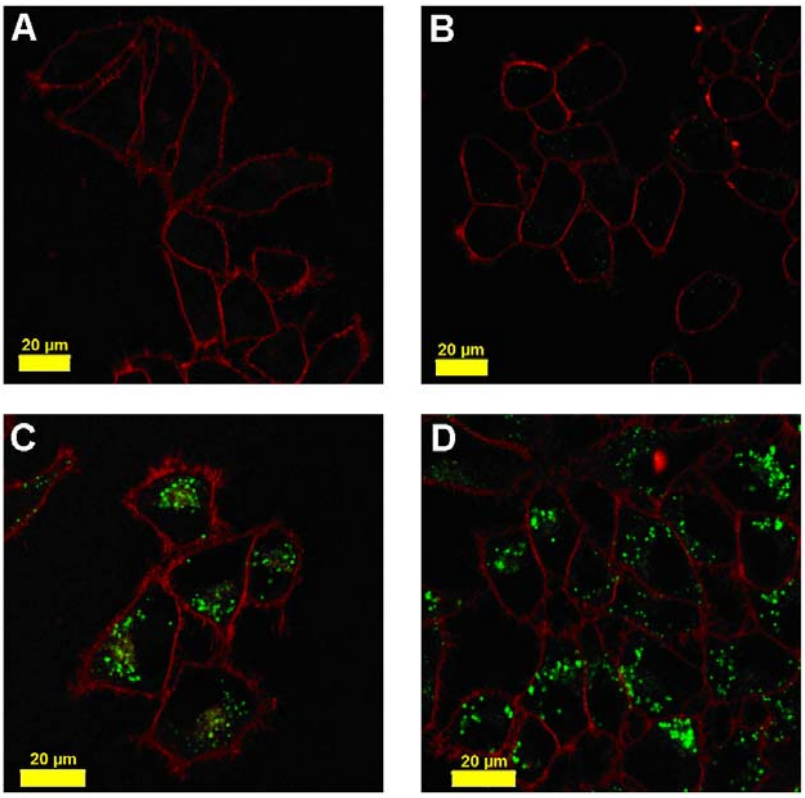


Abbildung 53: LSM-Analyse von HeLa-Zellen, die 24 h mit den fluoreszierenden magnetischen Partikeln VHMPM 2, 5, 10 und 20 inkubiert wurden. Die Zellmembran wurde mittels des Membranfarbstoffs RH414 rot eingefärbt. A: NK, B: VHMPM 2, C: VHMPM 5, D: VHMPM 10

5.5.3 Quantitative Eisenmessung

Nach 24 h Inkubation von HeLa-Zellen mit den Partikeln VHMPM 0-VHMPM 15) wurde der Eisengehalt pro Zelle mittels der Ferene-S-Methode ermittelt. Die Eisenbestimmungen ergaben fast kein gemessenes Eisen in der Zelle (siehe Abbildung 54). Das könnte zum einen an einer ineffektiven Verkapselung von Eisenoxid bei der Herstellung der Partikel liegen oder zum anderen an mangelnder Sensitivität des Tests für kleinere Mengen an intrazellulären Partikeln. Da hier von der Verwendung eines Transfektionsmittels abgesehen wurde und vermutlich geringere Mengen an Partikeln in die Zellen aufgenommen wurden, ist Letzteres eher wahrscheinlich. Ein weiterer Grund könnte auch die Stabilität der Polystyrolhülle der Partikel gegenüber Säuren darstellen. Es wäre wahrscheinlich, dass die Polystyrolhülle beim Säureverdau (Perchlorsäure-/Salpetersäuregemisch) nicht vollständig aufgeschlossen wurde und aus diesem Grund nicht das gesamte verkapselte Eisenoxid zur Eisenbestimmung zur Verfügung stand.

Die Partikel eignen sich aufgrund ihrer Bifunktionalität als Dual-Reporter für ein großes biomedizinisches Anwendungsgebiet, insbesondere für MRT- und Hyperthermie-Anwendungen. Aufgrund des eingebauten Fluoreszenzmarkers können sie sowohl im FACS als auch im Laser-Scanning-Mikroskop detektiert werden.

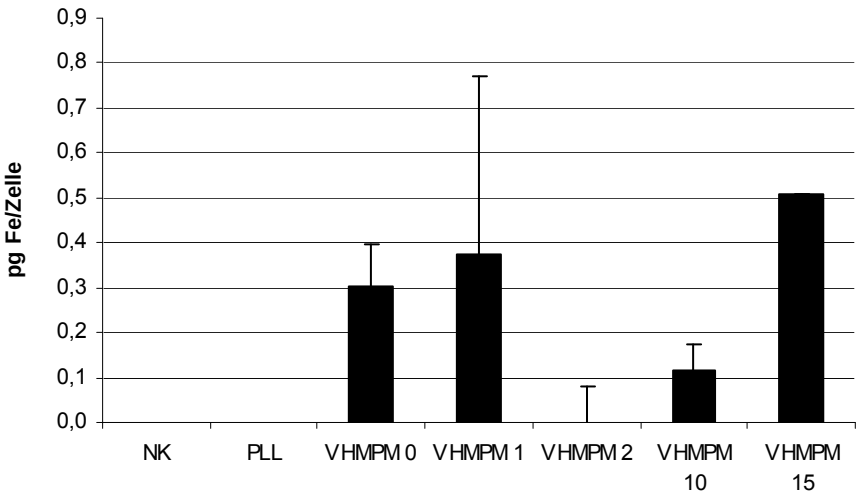


Abbildung 54: Eisenbestimmung von HeLa-Zellen mittels Ferene-S-Methode, die mit den fluoreszierenden magnetischen Partikeln VHMPM 0-15 24 h inkubiert wurden.

5.6 Gadoliniumpartikel

Mittels Miniemulsionspolymerisation wurden bifunktionale Gadoliniumnanopartikel von Nicole Jagielski am Institut für Organische Chemie III an der Universität Ulm synthetisiert. In die Partikel wurde bei der Synthese der Fluoreszenzfarbstoff PMI als Fluoreszenzmarker mit in die Partikel eingebaut. Neben der Verwendung als Kontrastmittel für die MRT können die Partikel auch im FACS oder CLSM für histologische Fragestellungen eingesetzt werden. Dabei wurde Laurylmethacrylat (LMA) als Monomer bei der Partikelsynthese eingesetzt. Die synthetisierten Gadoliniumpartikel weisen eine Zwiebelstruktur auf (siehe Abbildung 55). Die Oberflächenfunktionalisierung erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Acrylsäure bei der Polymerisation, wodurch eine Partikelreihe mit zunehmendem Gehalt an COOH-Gruppen auf der Partikeloberfläche synthetisiert wurde. Der Partikeldurchmesser nimmt mit steigendem Gehalt an COOH-Gruppen auf der Partikeloberfläche von 58 nm bis zu 179 nm zu (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Die Tabelle gibt den Durchmesser und die Oberflächenladung der fluoreszierenden Gadoliniumpartikel NJ-Gd 1-6 fluoro an. Bei der Synthese wurde als Monomer Laurylmethacrylat (LMA) verwendet.

Partikelbezeichnung	COO^--Gruppen pro Partikel	COO^--Gruppen pro nm^2	Durchmesser [nm]
NJ-Gd 1 fluoro	826	0,08	58
NJ-Gd 2 fluoro	5530	0,07	162
NJ-Gd 3 fluoro	1187	0,07	76
NJ-Gd 4 fluoro	1378	0,09	71
NJ-Gd 5 fluoro	45175	0,43	183
NJ-Gd 6 fluoro	26372	0,26	179

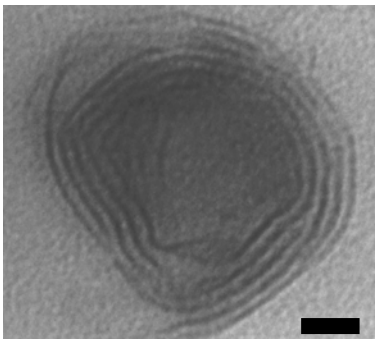


Abbildung 55: Gadoliniumpartikel aufgebaut aus mehreren Schalen. Maßstab 30 nm.

5.6.1 Fluoreszenzmessungen am FACS

MSCs, HeLa-, Jurkat- und KG1a-Zellen wurden 24 h mit den Gadolinium-Partikeln NJ-Gd 1-6 fluoro inkubiert. NJ-Gd 1 fluoro und NJ-Gd 2 fluoro erbrachten niedrigere Werte als der ungeladene Kontrollpartikel P1 (Polystyrol). Bei allen Zelllinien wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei den Partikeln NJ-Gd 3 fluoro, NJ-Gd 4 fluoro und NJ-Gd 5 fluoro gemessen. Die Partikel NJ-Gd 4, 5 und 6 fluoro zeigten die höchsten Werte (Abbildung 56 A, B, C und D). Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte der hohe Gehalt an Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Partikel NJ-Gd1-6 fluoro darstellen. Vermutlich beeinflusst auch das Polymer LMA die Partikelaufnahme in die Zellen.

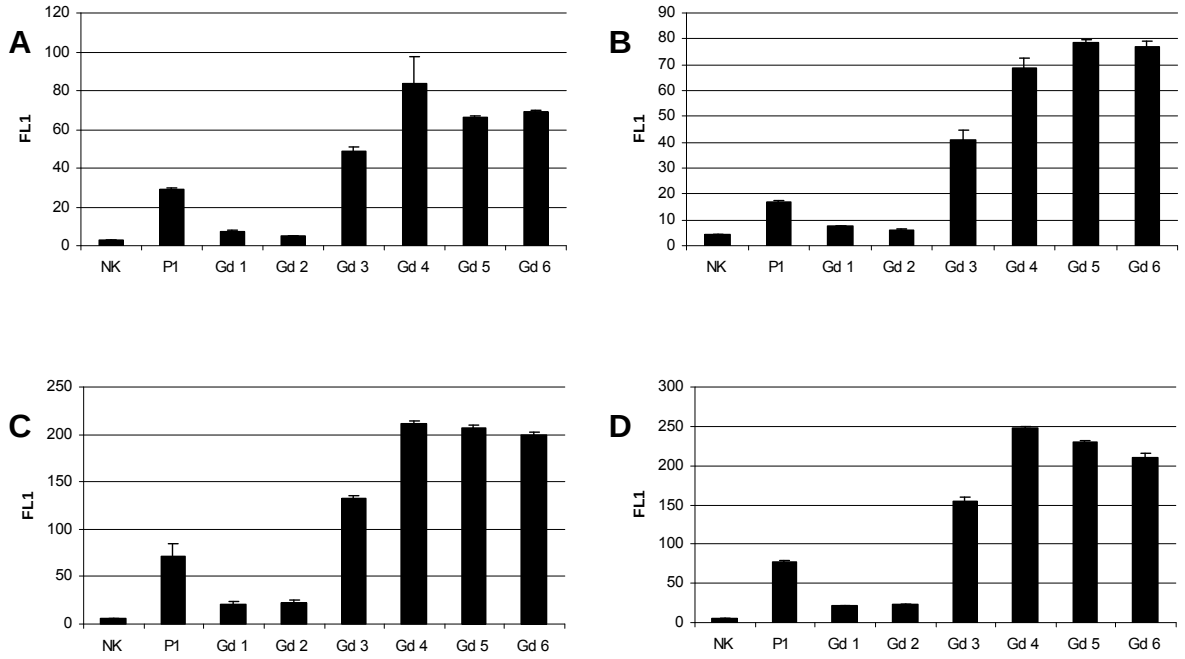


Abbildung 56: Nach 24-stündiger Inkubation von MSC, HeLa-, Jurkat- und KG1a-Zellen mit den Gadolinium-Partikeln NJ-Gd1-6 fluoro wurde im FACS die Fluoreszenzintensität bestimmt. A: HeLa; B: MSC; C: Jurkat; D: KG1a; Die Partikelbezeichnung Gd 1-6 wurde als Abkürzung der Partikel NJ-Gd 1-6 fluoro verwendet.

5.6.2 Lokalisation mittels CLSM

MSCs wurden zur CLSM-Analyse 24 h mit dem Polystyrolpartikel P1 (Kontrollpartikel) und mit den fluoreszierenden Gadoliniumpartikeln NJ-Gd 1, 2 5, und 6 fluoro inkubiert. Als Marker für die Zellmembran wurde auch in diesem Versuch RH414 eingesetzt. Die Negativkontrolle, die nicht mit Partikeln inkubiert wurde, zeigt auch keine grünen Fluoreszenzsignale. Der Kontrollpartikel P1 (Abbildung 57 B) zeigt eine deutlich stärkere Grünfluoreszenz im Zytoplasma als die Negativkontrolle und Zellen, die mit Gd1 oder Gd2 (Abbildung 57 C und D) behandelt wurden. Letztere zeigen eine verglichen mit der Negativkontrolle (Abbildung 57 A) nur wenig stärkere Grünfluoreszenz. Im Zytoplasma von Zellen, die mit NJ-Gd 5 und 6 fluoro inkubiert wurden, waren viele grüne Fluoreszenzsignale zu finden, die auf eine Partikelaufnahme in die Zellen hindeuten (Abbildung 57 E und F). Die LSM-Analyse bestätigt das Ergebnis der FACS-Analyse.

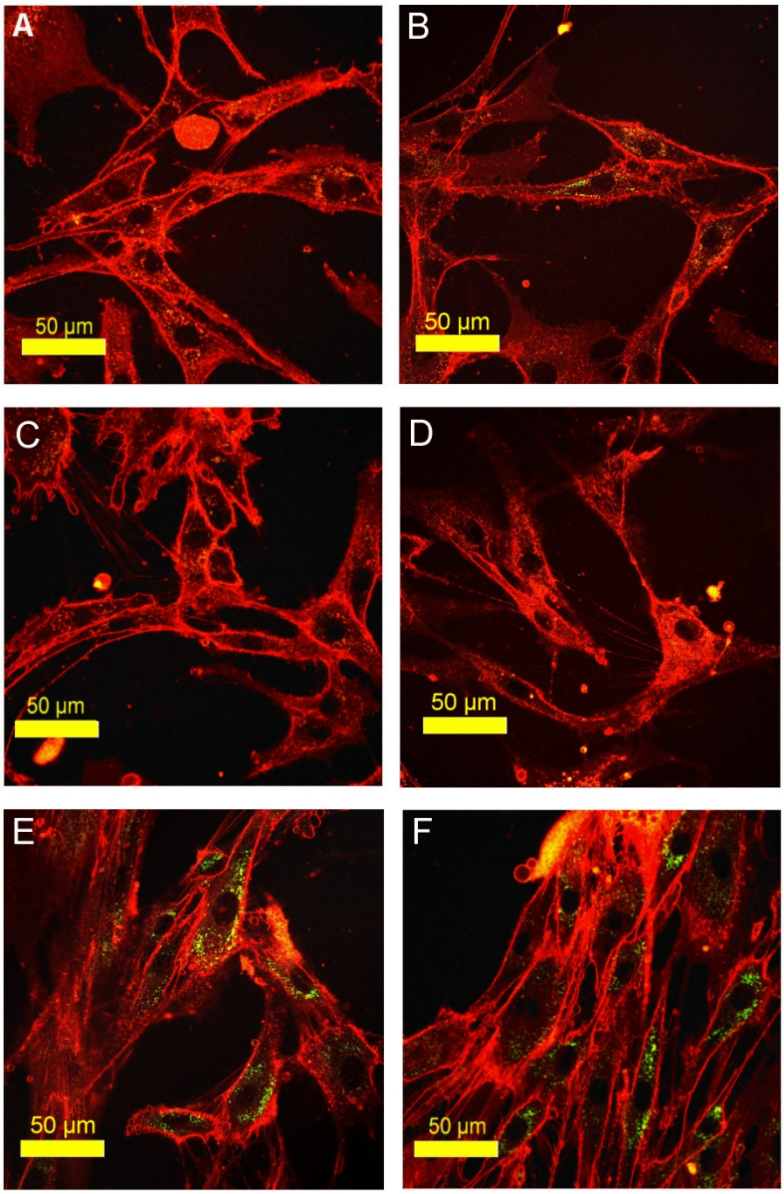


Abbildung 57: Die Negativkontrolle zeigt keine grünen Fluoreszenzsignale (A). Nach 24 stündiger Inkubation von MSCs mit Partikel Gd1 ist mit dem CLSM in den Zellen verglichen mit der Negativkontrolle nur eine gering erhöhte Grünfluoreszenz zu sehen, die auf eine sehr geringe Partikelaufnahme hinweist (B). Nach Inkubation von Partikel Gd 6 zeigen die Zellen im Zytoplasma viele grüne Fluoreszenzsignale, die im Bereich des Zellkerns fehlen (C).

5.6.3 Lokalisation mittels TEM

Um die genaue Partikelverteilung im Zytoplasma zu studieren, wurde eine TEM-Analyse durchgeführt. Dazu wurden MSCs 24 h mit den Partikeln inkubiert. Auf den ersten Blick scheinen hier Partikel in Clustern angeordnet und in Zellorganellen lokalisiert zu sein (Abbildung 58 B, Gd 4). Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man aber helle eiförmig erscheinende Bereiche, an denen das Material elektronenärmer

ist (Abbildung 58 C, Gd 3 und D, Gd 4). Diese Strukturen bei TEM-Schnitten sind bei der Negativkontrolle nicht zu finden (Abbildung 58 A). Es ist sehr wahrscheinlich dass es sich dabei um intrazelluläre Gadoliniumpartikel handelt, die im Elektronenstrahl nicht stabil sind.

Dies könnte an der Instabilität der Acrylsäure und LMA unter dem Elektronenstrahl des Mikroskops liegen. Neben Acrylsäure besitzt auch LMA einen niedrigen Glaspunkt und ist daher im Elektronenstrahl instabil.

Verschiedene klinisch relevante Zelllinien ließen sich in dieser Arbeit erfolgreich mit den gadoliniumhaltigen Nanopartikeln mit Carboxylgruppen auf der Oberfläche markieren. Die Gadoliniumpartikel könnten von größtem Interesse für biomedizinische Fragestellungen sein, da Gadolinium aufgrund seiner paramagnetischen Natur als Komplex in der Medizin häufig als Kontrastmittel eingesetzt wird. Mit Hilfe der Oberflächenfunktionalisierung konnte die Transfektionsrate der Partikel in die untersuchten Zelllinien erhöht werden.

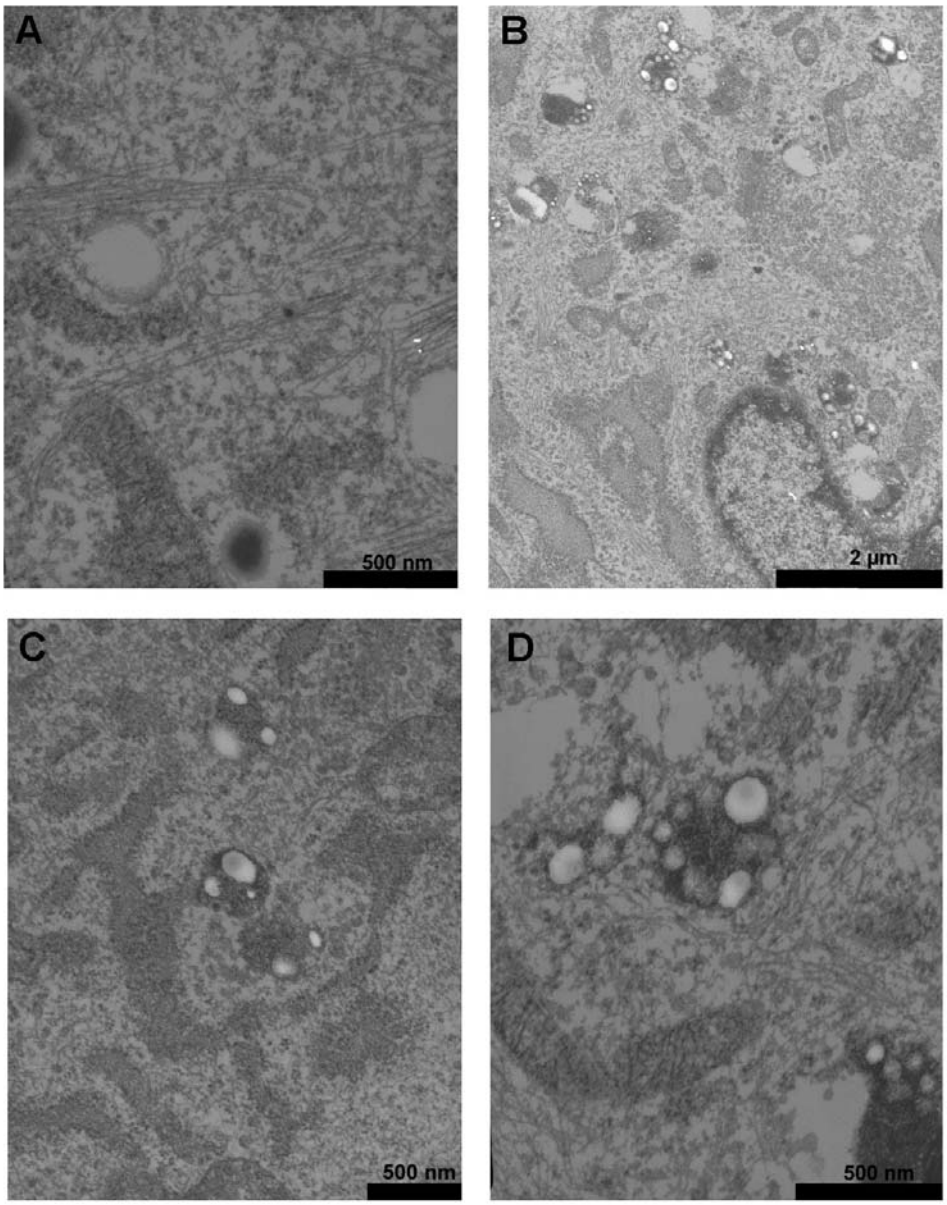


Abbildung 58: TEM-Analyse von MSCs, die 24 Stunden mit den Partikeln NJ-Gd 3 fluoro und NJ-Gd 4 fluoro inkubiert wurden. Die Negativkontrolle zeigt wie erwartet keine partikelähnlichen Strukturen (A). Übersicht über das Zytoplasma einer mesenchymalen Stammzelle, die mit den Partikeln Gd 4 behandelt wurden (B). Die hell erscheinenden ovalen Bereiche erscheinen zusammengedrängt zu Clustern. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um die Partikel in Zellkompartimenten. Cluster mit den hell erscheinenden ovalen Bereichen nach Markierung mit Gd 3 (C). Vergrößerter Ausschnitt aus dem Zytoplasma einer MSC nach Markierung mit Gd 4, an dem sich wahrscheinlich ein Partikelcluster befunden hat (D).

5.7 Polyisoprenpartikel

Mittels Miniemulsionspolymerisation von Isopren können Polyisoprennanopartikel hergestellt werden, die aufgrund der Modifizierbarkeit (z.B. Kopolymerisation) während oder nach der Polymerisation für biomedizinische Anwendungen interessant sind. Der Annahme, dass das Polymer auf die Partikelaufnahme in Zellen einen Einfluss hat, insbesondere bei natürlichen Strukturen, sollte auf den Grund gegangen werden. Polyisopren (PI) ist in vielen Strukturen in der Natur zu finden. Dabei stellt sich die Frage, welche der Strukturen des Isoprengerüsts, die Doppelbindungen oder die CH_3-Gruppen die Partikelaufnahme beeinflussen können. Die Doppelbindungen im Polyisoprengerüst können zur Funktionalisierung eingesetzt werden. Polyisoprenpartikel wurden von Maria-Verena Kohnle am Institut für Organische Chemie III im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert. Dabei wurde das Verfahren der Miniemulsionspolymerisation eingesetzt. Als Fluoreszenzmarker wurde PMI (Perylenmonoimid) bei der Synthese in die Partikel mit eingeschlossen. Die Größenverteilung der Partikel ist relativ homogen (siehe Abbildung 59) und beträgt durchschnittlich 192 nm bei Partikel mkpi033 und 145 nm bei Partikel mkpi067 (siehe Tabelle 10). Die Polyisoprenpartikel wurden hinsichtlich der Aufnahme in verschiedenen Zelllinien getestet. Faktoren wie Inkubationsdauer und Partikelkonzentration im Zellkulturmedium wurden mit in die Untersuchungen eingeschlossen. Da die Partikel nicht abgebaut werden, könnten sie in der Medizin für Langzeitanwendungen eingesetzt werden. Durch Kopolymerisation mit Polystyrol sollten die Eigenschaften der Partikel gezielt variiert werden.

Tabelle 10: Charakteristika der Polyisoprennanopartikel.

Probenbezeichnung	Partikelgröße [nm]
mkpi033	192
mkpi067	145

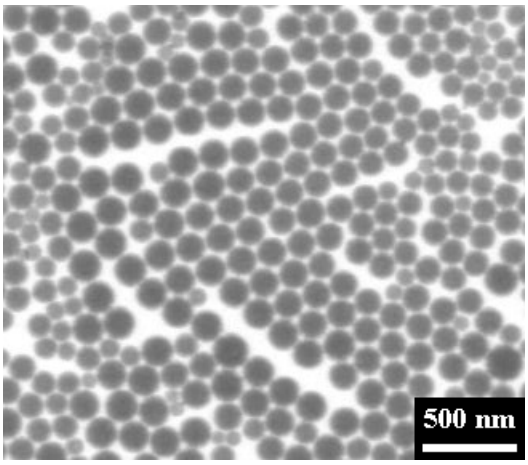


Abbildung 59: TEM-Bild von mkpi033.

5.7.1 Kinetik der Partikelaufnahme

Um die Aufnahmekinetik in HeLa und Jurkat zu bestimmen, wurden die Zellen in verschiedenen Zeitintervallen (0 min; 10 min; 0,5; 1; 2; 4; 16 und 48 h) mit den PI-Partikeln mkpi033 inkubiert und im FACS die Fluoreszenzintensität (FL1) bestimmt (Abbildung 71 A: HeLa; B:Jurkat). Schon nach wenigen Minuten wurde bei beiden Zelllinien ein beträchtlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen. Bei HeLa-Zellen betrug die nach 1 h gemessene Fluoreszenzintensität die Hälfte des nach 48 h gemessenen Werts. Bei beiden Zelllinien verläuft die Kurve bis zu einer Inkubationszeit von 1 h sehr steil und flacht nach 4 h allmählich ab. Der steile lineare Kurvenverlauf nach 1 h Inkubationszeit deutet auf eine sehr gute Partikelaufnahme hin. Das Plateau nach 4 h Inkubation weist auf eine Sättigung hin. Bei PI-Partikeln hat die hauptsächliche Partikelaufnahme schon in den ersten 4 h stattgefunden, während bei Polystyrolpartikeln erst nach 4 h die Partikelaufnahme in die Zellen stark ansteigt und nach 24 h noch nicht einmal ein Plateau erreicht (siehe Kinetik der Partikelaufnahme 5.3.1.1.5). Aufgrund dieser unterschiedlichen Aufnahmekinetiken für Polyisopren- und Polystyrolnanopartikel ist es wahrscheinlich, dass hier auch unterschiedliche Aufnahmemechanismen vorliegen.

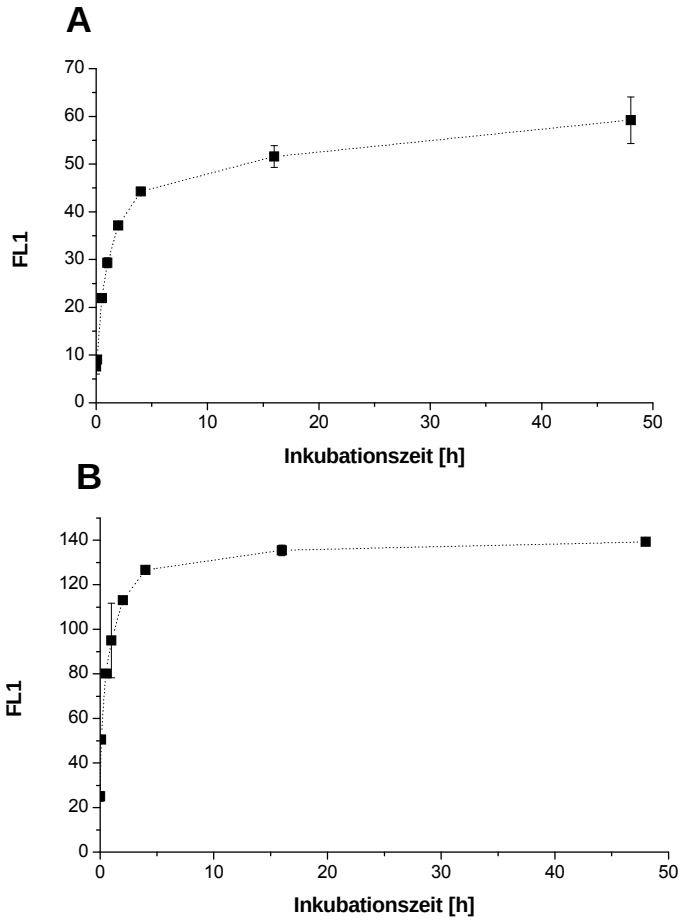


Abbildung 60: FACS-Messung der Fluoreszenzintensität von HeLa (A) und Jurkat (B) nach verschiedenen Zeitintervallen (0; 0,08; 0,5; 1; 2; 4; 16 und 48 h). Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Polyisoprenpartikeln mkpi033 inkubiert.

5.7.2 Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Konzentration

Da die Inkubationsdauer die Partikelaufnahme in die Zellen beeinflusst, wurde nun untersucht, ob die Partikelkonzentration im Kulturmedium bei der Aufnahme der Partikel in die Zellen einen Einfluss besitzt. Dazu wurden HeLa- und Jurkat-Zellen mit einer ansteigenden Partikelkonzentration (mkpi033) im Kulturmedium (37,5; 75, 150; 300; 600; 1200; 2400 und 4800 µg/mL Medium) 24 h lang inkubiert und anschließend im FACS die Fluoreszenzintensität ermittelt. Bei HeLa- und Jurkat-Zellen wurden sehr hohe FL1-Werte gemessen. Es besteht eine Korrelation zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und der eingesetzten Partikelkonzentration (Abbildung 74 A und B). Der im FACS gemessene FL1-Wert

steigt mit der Erhöhung der PI-Partikelkonzentration im Medium linear bis zu einer Partikelkonzentration an 1200 µg an. Höhere Konzentrationen an Polyisoprenpartikeln im Zellkulturmedium resultieren bei beiden Zelllinien in einem flacheren Kurvenverlauf. Bei Jurkat-Zellen ist selbst nach Zugabe der Partikel in einer Konzentration von 4800 µg/mL Medium eine Sättigung noch nicht erreicht. Das Plateau des Graphen bei HeLa-Zellen stellt einen Zustand der Sättigung dar, der sich aufgrund der Erschöpfung der Endozytose oder der Speicherkapazität der Zellen für Nanopartikel einstellen könnte.

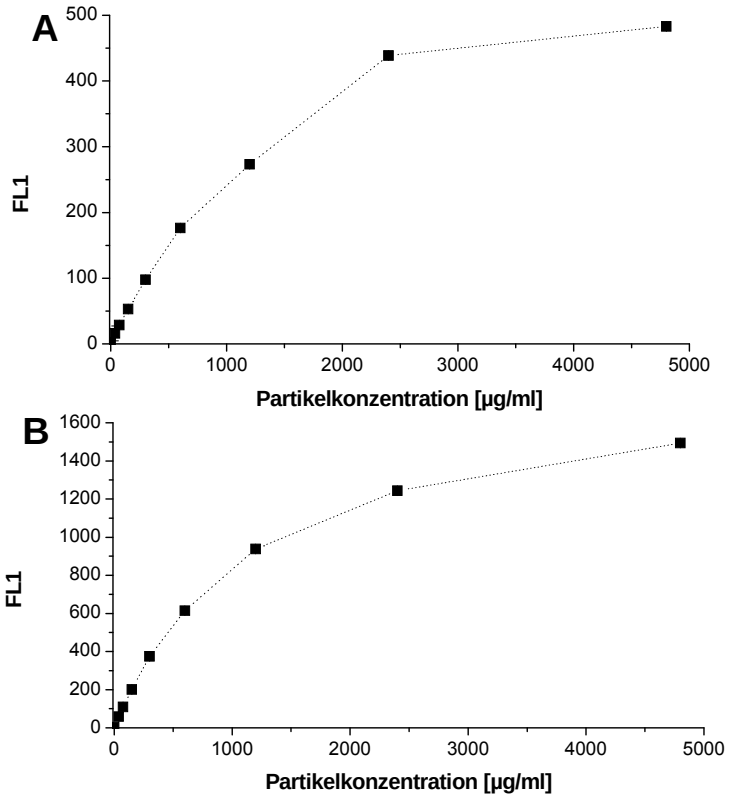


Abbildung 61: FACS-Messung der Fluoreszenzintensität von HeLa (A) und Jurkat (B) nach Zugabe unterschiedlicher Polyisoprenpartikelkonzentrationen ins Medium.

5.7.3 Aufnahme oberflächenmodifizierter Polyisoprenpartikel

Verschiedene Parameter verändern die Oberflächeneigenschaften der Partikel, wodurch auch die Partikelaufnahme in Zellen beeinflusst werden kann. Bei der Partikelsynthese wird SDS als Emulgator eingesetzt. Die Sulfatgruppen liegen an der Partikeloberfläche vor und verursachen dadurch einen Anstieg an negativer Ladung auf der Partikeloberfläche. Dieser Anstieg an negativer Ladung auf der Partikeloberfläche könnte die Partikelaufnahme in Zellen beeinflussen, was für Polystyrolpartikel bereits in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe Kapitel 5.2.1). Daher sollte die Aufnahme von Partikeln mit SDS und ohne SDS miteinander verglichen werden. Um Partikel ohne SDS zu erhalten, wurde das SDS in der Partikeldispersion durch Dialyse entfernt. Auch Transfektionsmittel, die meistens positiv geladen sind, vermögen die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen zu beeinflussen und führen zu höherer Partikelaufnahme [134, 158, 159, 178, 210].
Um mehr Kenntnisse über die beiden Parameter im Hinblick auf die Internalisation von Polyisoprenpartikeln zu gewinnen, wurden HeLa-Zellen 0,5, 4 und 24 h mit nicht dialysierten (mit SDS) und dialysierten (ohne SDS) PI-Partikeln mkpi067 (75 µg/mL Medium) mit und ohne Zugabe des Transfektionsmittels PLL (1,5 mg/ML medium) inkubiert und die relative Fluoreszenzintensität im FACS gemessen (siehe Abbildung 62). Das Diagramm zeigt eine etwas höhere Fluoreszenzintensität für dialysierte Partikel. Nach 4 h Inkubation ist die Fluoreszenzintensität dialysierter Partikel fast doppelt so hoch wie bei undialysierten Partikeln. Dabei machte es keinen Unterschied, wenn PLL zugegeben wurde. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde nach 24 h Inkubation mit PLL erreicht. Der höhere Gehalt an negativer Ladung auf der Partikeloberfläche bei undialysierten Partikeln scheint die Partikelaufnahme in die Zellen zu beeinträchtigen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die Abstoßungskräfte der negativ geladenen Partikeln gegenüber der negativ geladenen Zellmembran darstellen. Da die FACS-Analyse nicht zwischen intrazellulären Partikeln und extrazellulären Partikelanlagerungen an die Zellmembran unterscheiden kann, wurde eine CLSM-Analyse durchgeführt.

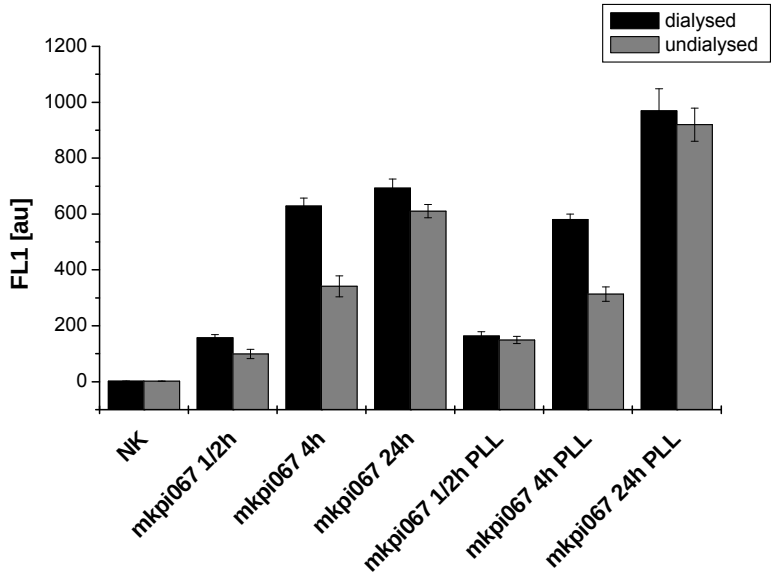


Abbildung 62: FACS-Analyse von HeLa-Zellen nach 0,5, 4 und 24 h Inkubation mit den Polyisoprenpartikeln mkpi067.

5.7.4 Lokalisation mittels CLSM

Zur CLSM-Analyse wurden HeLa-Zellen 4 h (Abbildung 63 A: ohne PLL und B: mit PLL) und 24 h (Abbildung 63 C: ohne PLL und D: mit PLL) mit und ohne PLL inkubiert. Undialysierte Partikel wurden 24 h ohne (Abbildung 63 E) und mit PLL (Abbildung 63 F) inkubiert. Die Zellmembran wurde mit dem kommerziellen Farbstoff RH414 zur Visualisierung angefärbt, so dass eine genaue Unterscheidung intrazellulärer versus extrazelluläre Partikel möglich war. Undialysierte und dialysierte Partikel zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster grüner Fluoreszenzsignale im Zytoplasma. Nach 4 h Inkubation zeigen dialysierte Partikel, die mit PLL inkubiert wurden eine schwächere Signalintensität als dialysierte und undialysierte Partikel, die 24 h inkubiert wurden. Es ist bei Zellen, die mit PLL und Partikeln inkubiert wurden außerdem am Overlay der rot fluoreszierenden Zellmembran und der grün fluoreszierenden Partikel eine beträchtliche Partikelaggregation deutlich zu erkennen. Die CLSM-Analyse zeigt zwei unterschiedliche Arten von Fluoreszenzsignalen. Es sind in den Zellen große stark fluoreszierende und schwach fluoreszierende grüne Signale zu erkennen. Die schwachen Fluoreszenzsignale sind homogen im Zytoplasma verteilt, während die intensiv fluoreszierenden grünen Punkte eine heterogene Verteilung im Zytoplasma aufweisen. Bei den schwachen Fluoreszenzsignalen könnte es sich um einzelne verstreute Partikel in Endosomen handeln. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die stark fluoreszierenden Bereiche

Partikelcluster in Endosomen darstellen. Dies wurde bereits für Polystyrolpartikel in HeLa- und Jurkat-Zellen gezeigt (siehe Kapitel 5.3.1.1.3). Der Anstieg des Fluoreszenzsignals nach 24 h Inkubation der Partikel mit PLL könnte durch die starke Aggregation der Partikel zu erklären sein. Ein Anstieg der Koagulation mit der Inkubationsdauer wurde auch bei dem Kontrastmittel Resovist mit PLL gefunden.
CLSM-Analyse wurde auch mit Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubation mit dem dialysierten Polyisoprenpartikel mkpi067 durchgeführt. Grüne Fluoreszenzsignale wurden in den Zellen gefunden, die auf eine intrazelluläre Partikelaufnahme hindeuten (Abbildung 64). Das ist ein überraschendes Ergebnis, da bisher für Polystyrolpartikel in Jurkat-Zellen nie eine derartig große Partikelaufnahme beobachtet wurde. Neben der unterschiedlichen Aufnahmekinetik für PI-Nanopartikel könnte dieses Ergebnis auch auf einen anderen Aufnahmemechanismus als bei PI-Partikeln hinweisen. Denn die schwache homogene Verteilung von Fluoreszenzsignalen könnte auf eine Aufnahme einzelner PI-Partikel in die Zelle hinweisen. Bei Polystyrolpartikeln wurde die Aufnahme in Cluster beobachtet. Damit ist das ein guter Hinweis auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen der Partikel.

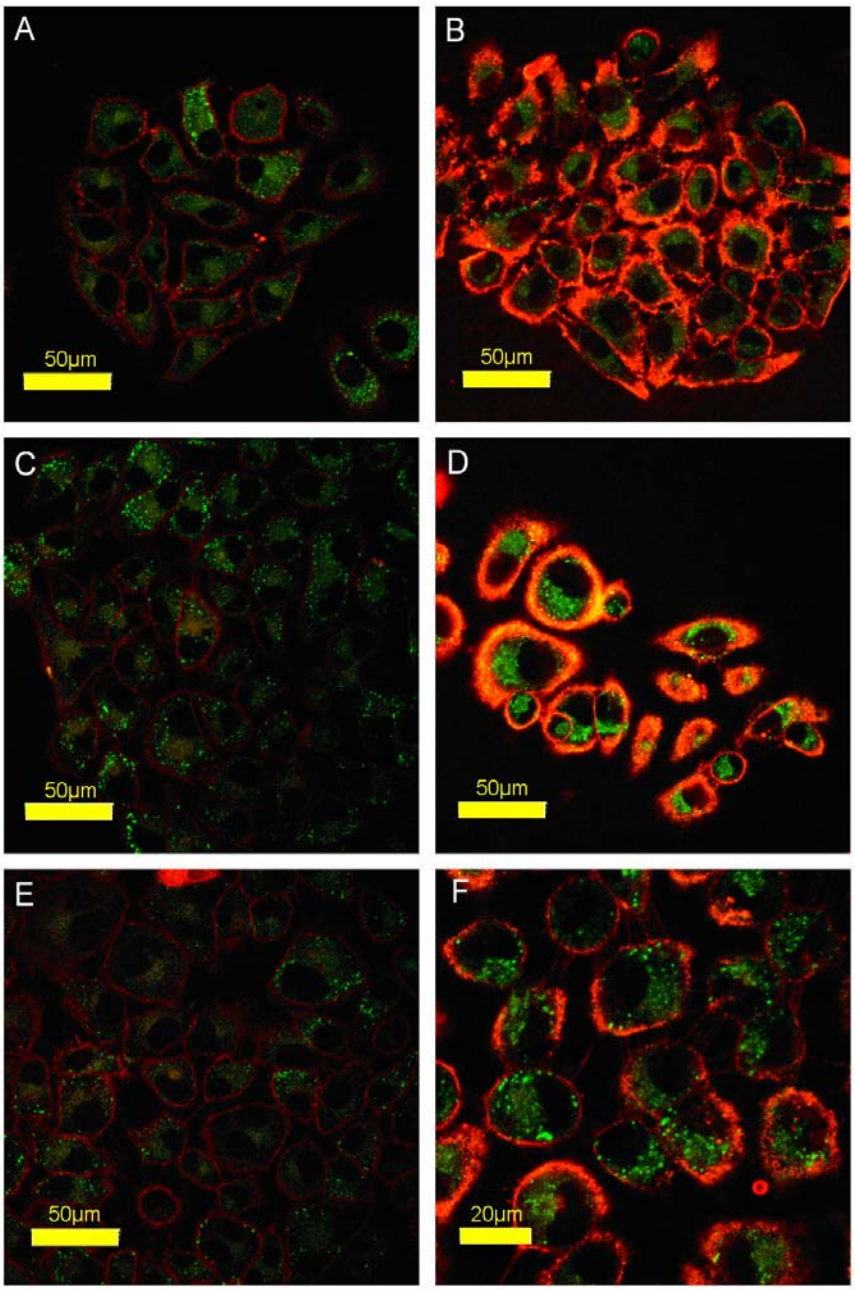


Abbildung 63: CLSM-Analyse von HeLa-Zellen nach Inkubation mit den PI-Nanopartikeln mkpi067. Die Zellen nach 4 h (A: ohne PLL und B: mit PLL) und 24 h (C: ohne PLL und D: mit PLL) Inkubation mit und ohne PLL. Undialysierte Partikel nach 24 h Inkubation ohne (E) und mit PLL (F).

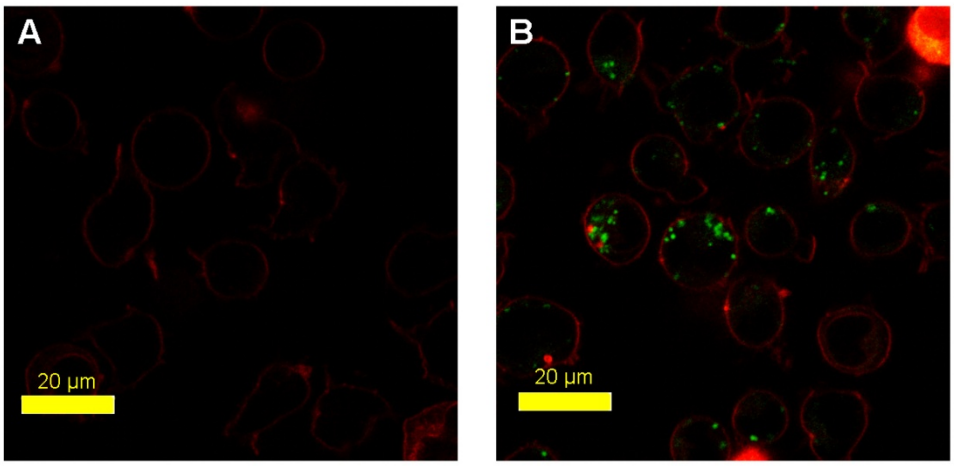


Abbildung 64: CLSM-Analyse von Jurkat-Zellen (A: Negativkontrolle) nach 24 h Inkubation mit dem dialysierten Polyisoprenpartikel mkpi067 (B).

5.7.5 Lokalisation mittels TEM

HeLa-Zellen wurden mit PI-Nanopartikeln mkpi067 30 min und 4 h inkubiert. Da bei früheren TEM-Analysen, bei denen eine Partikelkonzentration von 75 µg/ml eingesetzt wurde, nur sehr schwer intrazelluläre Partikel detektiert wurden und eine Partikelkonzentration von 300 µg/mL im linearen Bereich der Kurve für die Partikelkonzentration liegt (siehe Kapitel 5.7.2), wurden für die TEM-Analysen Partikelkonzentrationen von 300 µg/mL eingesetzt. Eine weitere Erhöhung der Partikelaufnahme konnte durch den Einsatz von PLL erreicht werden. Um den physiologischen Zustand der Proben zu erhalten, wurden die Proben hochdruckgefroren. Mit Hilfe des Hochdruckgefrierens und der Gefrierätzung [225] kann zum einen der physiologische Zustand der Probe „eingefroren“ werden. Zum anderen können bei der relativ schnellen Fixierung des Materials Membranstrukturen gut erhalten werden. Nach der Cryofixierung erfolgt eine langsame Erwärmung der Proben auf Raumtemperatur [226].
Die Probenpräparation und anschließende TEM-Analyse wurden von Martin Dass durchgeführt [227].
Intrazelluläre Polyisoprennanopartikel befinden sich bereits nach 30 min Inkubation im Zytoplasma der HeLa-Zellen und sind als schwarze Punkte in Clustern angeordnet (Abbildung 65 A kryofixiert und B chemisch fixiert). Da die Probe chemisch fixiert wurde (B), sind die Membranstrukturen hier nicht so deutlich erhalten. Die Partikel sind nicht nur als Cluster (Abbildung 65 C, 4 h Inkubation, kryofixiert), sondern auch als einzelne Partikel in Endosomen lokalisiert (Abbildung 65 D, 4 h Inkubation, kryofixiert). Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, dass die schwachen homogen im Zytoplasma verteilten Fluoreszenzsignale bei der

CLSM-Analyse von einzelnen Partikeln verursacht werden.

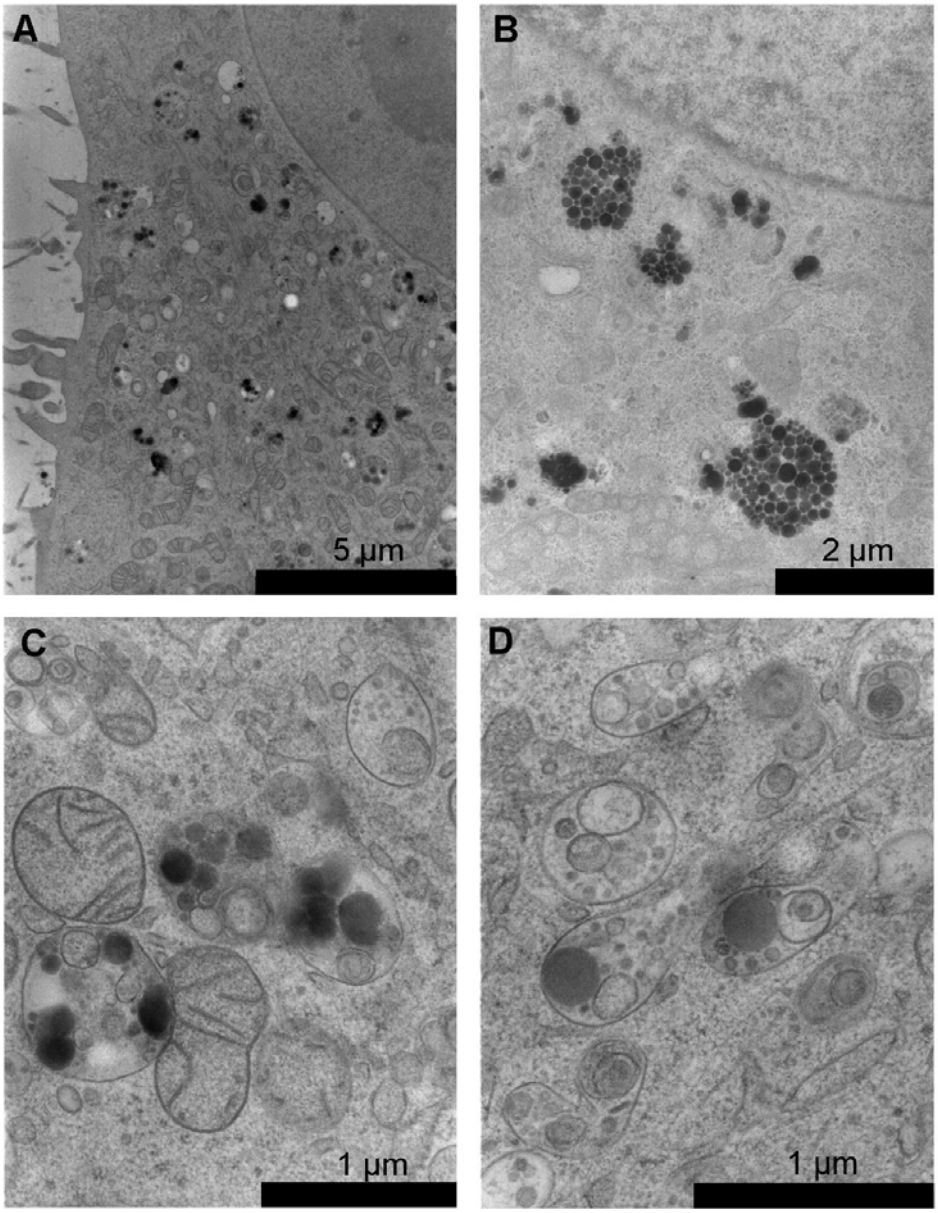


Abbildung 65: TEM-Analyse von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Polyisoprennanopartikeln mkpi067 und PLL. A: Zytoplasma mit vielen intrazellulären Partikelclustern nach 30 min Inkubation; Cryofixierung; B: Intrazelluläre Partikelcluster nach 30 min Inkubation; chemisch fixiert, C: Partikelcluster in Endosomen nach 4 h Inkubation; kryofixiert, D: einzelne Partikel in Endosomen nach 4 h Inkubation; kryofixiert.

5.7.6 Lokalisation mittels SEM

Die Anlagerung der Partikel an die Zellmembran sollte genauer untersucht werden. Dazu wurden die Polyisoprennanopartikel mkpi067 4 h mit HeLa-Zellen inkubiert. Die Partikel wurden mit einem Feststoffgehalt von 300 µg pro mL Medium zugegeben.

Außerdem wurde das Transfektionsmittel PLL eingesetzt, wodurch sich der Anteil der Partikelaggregationen auf der Zellmembran erhöht und mehr Partikel in die Zellen aufgenommen werden. Die Präparation und anschließende SEM-Analyse wurden von Martin Dass durchgeführt.

Die hellen Bereiche auf der Zelloberfläche könnten bereits aufgenommene Partikelcluster darstellen (Abbildung 66 A). Die SEM-Analyse zeigt die Polyisoprenpartikel mkpi066 nach 4 stündiger Inkubation auf der Zelloberfläche von HeLa-Zellen (Abbildung 66 B). Sie sind in Clustern angeordnet und werden von den Microvilli der Zellen bzw. der Zellmembran umschlossen (Abbildung 66 B). Eine Beteiligung der Microvilli bzw. Pseudopodien wurde in früheren Versuchen mit Polystyrolpartikeln bereits beobachtet (siehe Kapitel 5.3.1.1.3). Clathrin-vermittelten Endozytose könnte bei den Polyisoprenpartikeln aufgrund ihres Partikeldurchmessers von 145 nm noch vorkommen, denn in der Literatur wird von Partikelaufnahmen von bis zu 200 nm Partikeldurchmesser bei der Clathrin-vermittelten Endozytose beschrieben [223]. Im TEM wurden jedoch keine Clathrinstrukturen um die Vesikel gefunden, weshalb dieser Endozytoseweg nicht sehr wahrscheinlich ist. Der am ehesten wahrscheinliche Endozytosemechanismus ist hier die Makropinozytose, wobei neben flüssigen Substanzen auch partikuläre Bestandteile bis in dem Größenbereich von Mikrometern aufgenommen werden [223]. Außerdem spielen Pseudopodien/Microvilli beim Anlagerungsprozess der Partikel an die Zellmembran und auch beim Aufnahmeprozess eine wichtige Rolle. Eine Beteiligung der Microvilli konnte in diesem Versuch bei der Partikelanlagerung auf der Zellmembran beobachtet werden.

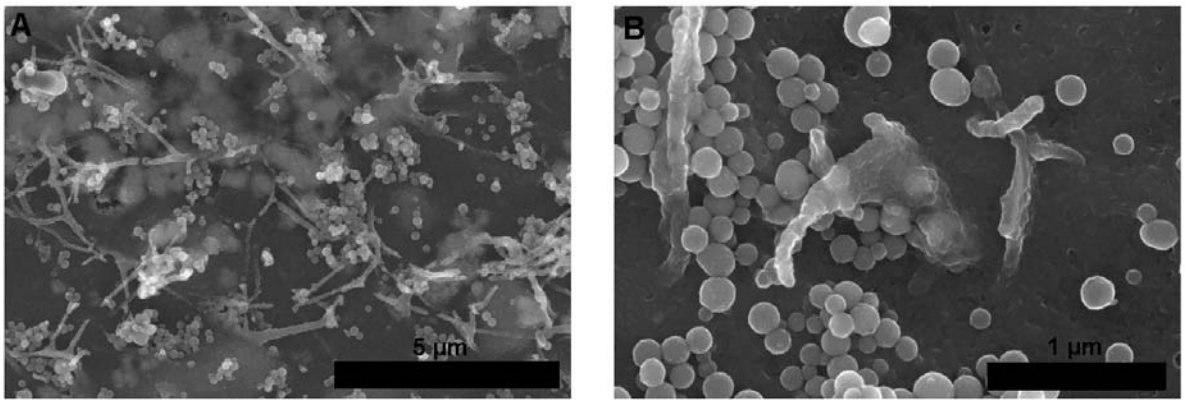


Abbildung 66: SEM-Analyse von HeLa nach 4 stündiger Inkubation von Polyisoprenpartikeln mkpi066 mit dem Transfektionsmittel PLL. An manchen Bereichen der Zellmembran liegen extrazellulär keine Partikel vor (A). Die Partikel sind in Clustern an die Zellmembran angelagert (B).

5.7.7 Fluoreszenzmessungen am FACS

Da Polyisoprennanopartikel eine viel bessere Partikelaufnahme in die untersuchten Zelllinien HeLa und Jurkat zeigen als Polystyrolnanopartikel, sollte der Polyisoprenanteil der Partikel durch Kopolymerisation gezielt variiert werden und damit der Einfluss des Polyisoprengehaltes der Partikel auf die Partikelaufnahme untersucht werden. Dazu wurden Copolymerpartikel mit unterschiedlichen Polyisopren/Polystyrolanteilen synthetisiert. In Tabelle 11 sind die Co-Polymerpartikel nach abnehmendem bei der Synthese eingesetztem Isoprenanteil und zunehmendem Styrolanteil angeordnet. Die Partikel zeigen eine relativ einheitliche Größenverteilung.

Tabelle 11: Co-Polymerpartikel, nach abnehmendem Isoprenanteil und zunehmendem Styrolanteil angeordnet.

Probenbezeichnung	Isoprenanteil [%]	Styrolanteil [%]	Partikelgröße [nm]
mkpi067	100	0	145
mksi13	90	10	168
mksi12	80	20	163
mksi11	70	30	154
mksi10	60	40	158
mksi09	50	50	155
mksi15	30	70	141
mksi06	20	80	131
mksi05	10	90	134
mksi14	0	100	148

Die Copolymerpartikel wurden ohne den Einsatz eines Transfektionsmittels 24 h mit HeLa- und Jurkat-Zellen inkubiert und Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS durchgeführt. Alle Partikel wurden in einer Konzentration von 75 µg/mL ins Kulturmedium zugegeben. Die Partikel wurden nach steigender Menge an bei der Partikelsynthese eingesetztem Polyisopren und abnehmender Menge an Polystyrol aufgetragen. Die Partikel zeigen eine Korrelation der Fluoreszenzintensität und der Menge an eingesetztem Polyisopren in beiden Zelllinien (Abbildung 67). Je höher der Polyisoprenanteil der Partikel ist, desto höher ist auch die gemessene Fluoreszenzintensität. Dabei zeigen Jurkat-Zellen (B) bei gleicher Partikelzugabe ein

gleiches Verteilungsmuster und eine doppelt so hohe Fluoreszenzintensität wie HeLa-Zellen (A). Die Partikel wurden dialysiert, um das als Emulgator bei der Synthese eingesetzte SDS zu entfernen. Der Vergleich dialysierter und undialysierter Partikel sollte klären, ob die negative Oberflächenladung undialysierter Partikel eine Auswirkung auf die Partikelaufnahme hat. Bei undialysierten und dialysierten Partikeln wurde eine ähnliche Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 67 A und B). Daher scheint sich der Effekt des bei der Partikelsynthese eingesetzten SDS, das bei undialysierten Partikeln zur negativen Oberflächenladung (Sulfat-Gruppen) beiträgt, kaum auf die Partikelaufnahme auszuwirken.
Aufgrund ähnlicher Partikelgröße der einzelnen Proben ist die unterschiedliche Polymerzusammensetzung für die zunehmende Partikelaufnahme der Copolymerpartikel von 0 bis 100 % Polyisoprenanteil verantwortlich. Polyisopren begünstigt die Partikelaufnahme in die Zellen. Daran könnten entweder die CH_3-Gruppen oder aber die Doppelbindung des Isoprengerüsts beteiligt sein. In laufenden Experimenten mit Polybutadienpartikeln gibt es erste Hinweise, dass die CH3-Gruppen für die Partikelaufnahme von Bedeutung sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aufnahme von Polyisopren/Polystyrol-Copolymerpartikeln durch den Gehalt an Polyisopren in den Partikeln kontrolliert werden kann.

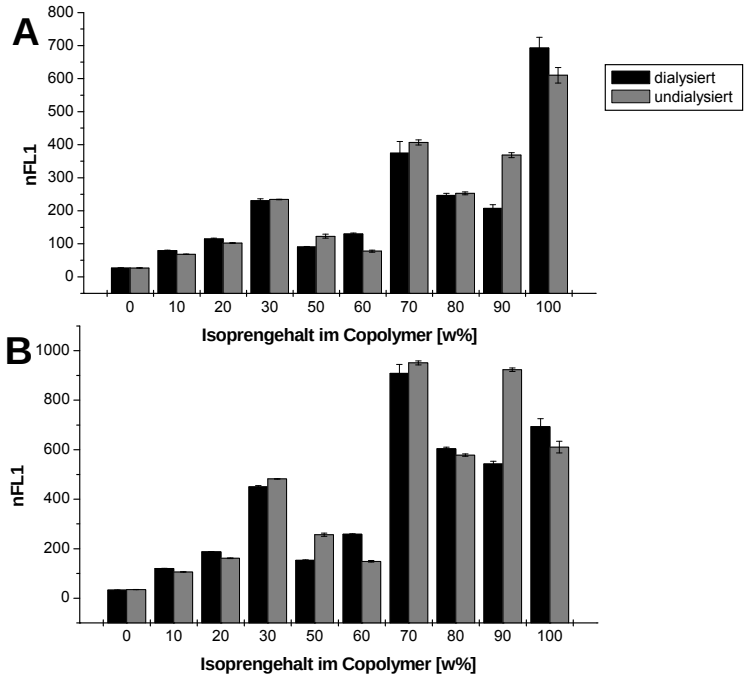


Abbildung 67: FACS-Messungen von HeLa und Jurkat nach 24-stündiger Inkubation mit Co-Polymerpartikeln unterschiedlicher Polyisopren/Polystyrolanteile. Bei HeLa- (A) und Jurkat-Zellen (B) steigt die gemessene Fluoreszenzintensität mit zunehmendem Polyisoprenanteil an. Dialysierte (mksi dial) und undialysierte (mksi undial) Proben zeigen ähnliche Fluoreszenzintensitäten.

5.7.8 Lokalisation mittels CLSM

Um die Partikelverteilung der Copolymerpartikel in der Zelle und eventuell an die Zellmembran angelagerte Partikel genauer zu analysieren, wurden HeLa- und Jurkat-Zellen im CLSM untersucht (siehe Abbildung 82 und Abbildung 69). HeLa- und Jurkat-Zellen wurden mit dialysierten Copolymerpartikeln mit 0%, 20% und 80% Polyisoprengehalt und einer Partikelkonzentration im Medium von 75 µg/mL 24 h inkubiert. Zur CLSM-Analyse wurde die Zellmembran mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff RH414 angefärbt, um zwischen intra- und extrazellulären Fluoreszenzsignalen differenzieren zu können. Die Negativkontrolle, die nicht mit den fluoreszierenden Partikeln inkubiert wurde, zeigt bei beiden Zelllinien keine grünen Fluoreszenzsignale (Abbildung 82 und Abbildung 69 A). Zellen, die mit Copolymernanopartikeln mit einem Polyisoprenanteil von 0 (Abbildung 82 B und Abbildung 69 B) und 20% (Abbildung 82 C und Abbildung 69 C) inkubiert wurden, zeigen auch keine grünen Fluoreszenzsignale, was keine Aufnahme von Partikeln in die Zellen oder auf eine sehr geringe Aufnahme, die unter dem Detektionslimit der CLSM-Analyse liegt, hinweist. Bei Partikeln mit einem Polyisoprengehalt von 80% sind bei beiden Zelllinien intrazelluläre grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen (Abbildung 82 D und Abbildung 69 D). Diese Beobachtungen stimmen mit den FACS-Ergebnissen überein, wobei Copolymerpartikel mit einem hohen PI-Anteil gut in die Zellen aufgenommen werden und Partikel mit einem geringen/keinem PI-Anteil (d.h. reine Polystyrol-Partikel) auch nur schlecht oder gar nicht von den Zellen aufgenommen werden. Es wurden keine extrazellulären Partikelanlagerungen an die Zellmembran gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Partikel nicht so stark aggregieren. Das Verteilungsmuster der intrazellulären grünen Fluoreszenzsignale zeigt sowohl heterogen als auch homogen verteilte Fluoreszenzsignale. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den großen Fluoreszenzsignalen um Partikelcluster handelt, die sich in Endosomen befinden, und es sich bei den schwachen homogen verteilten Fluoreszenzsignalen um einzelne Partikel in Endosomen handelt, da diese Verteilung von Polyisoprenpartikeln im TEM für HeLa-Zellen bereits gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 5.7.5).

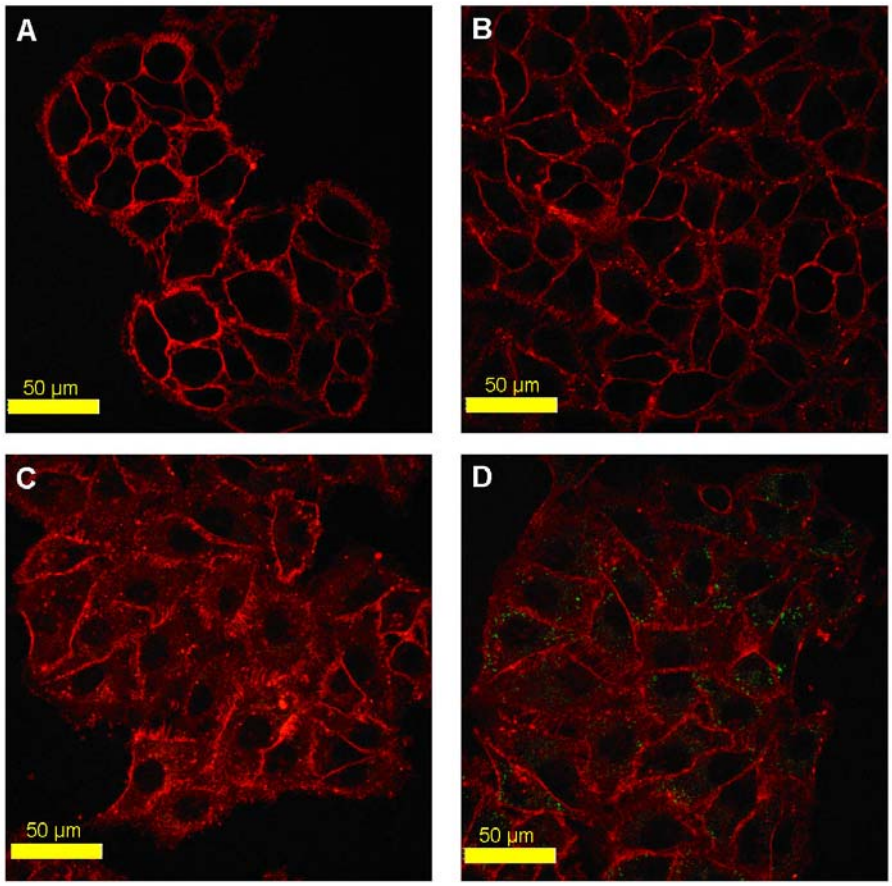


Abbildung 68: LSM-Analyse von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Polyisopren/Polystyrol-Co-Polymerpartikeln. Die Negativkontrolle (A) und Zellen, die mit Copolymerpartikeln mit einem Polyisoprengehalt von 0 (B) und 20% (C) inkubiert wurden, zeigen keine grünen Fluoreszenzsignale, während bei Zellen, die mit Copolymerpartikeln mit einem Polyisoprenanteil von 80% (D) inkubiert wurden, einige grüne Fluoreszenzsignale in den Zellen zu erkennen sind.

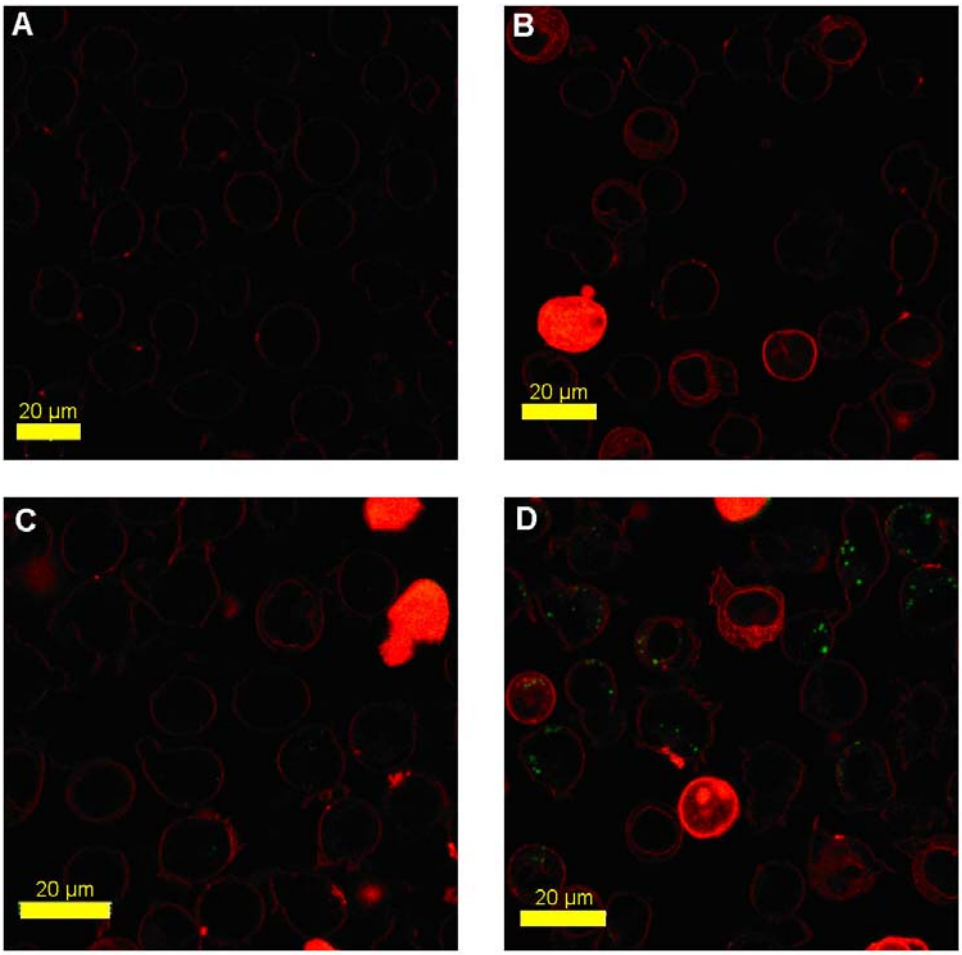


Abbildung 69: LSM von Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubation mit Polyisopren/Polystyrol-Co-Polymerpartikeln. Die Negativkontrolle (A) und Zellen, die mit Copolymerpartikeln mit einem Polyisoprengehalt von 0 (B) und 20% (C) inkubiert wurden, zeigen keine grünen Fluoreszenzsignale, während bei Zellen, die mit Copolymerpartikeln mit einem Polyisoprenanteil von 80% (D) inkubiert wurden, einige grüne Fluoreszenzsignale in den Zellen aufweisen.

5.8 Poly(n-butylcyanacrylat)-Partikel

Poly(n-butylcyanacrylat)-Partikel (PBCA) wurden von Dr. Clemens Weiss am Institut für Organische Chemie III an der Universität Ulm mittels Miniemulsionspolymerisation synthetisiert.

Es wurden nicht-funktionalisierte und funktionalisierte Partikel synthetisiert (siehe Tabelle 12). Als Funktionalisierung wurde Phenylalanin und PEG auf der Oberfläche der Partikel angebunden. Die Partikel besitzen Durchmesser von weniger als 260 nm. Die Partikelaufnahme sowie die Zytotoxizität der Partikel wurden in verschiedenen Zelllinien (HeLa, Jurkat, MSCs) untersucht.

PBCA-Partikel zeichnen sich durch Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit aus, was sie für biomedizinische Anwendungen äußerst interessant macht.
PBCA-Partikel werden bereits für biomedizinische Applikationen eingesetzt [23, 66-71]. Deren Bioabbaubarkeit erlaubt es, verkapselte Medikamente kontrolliert in Zielgewebe von Patienten freizusetzen. Die Abbaurate des Polymers hängt dabei von der Art des Cyanacrylates ab. PBCA-Nanopartikel besitzen aufgrund ihrer toxischen Abbauprodukte n-Butanol und Poly(cyanacrylsäure) auch zytotoxische Eigenschaften [22, 228, 229], die von der Art des Cyanacrylates und der Größe des Nanopartikels abhängen.

Tabelle 12: Eigenschaften der PBCA-Partikel.

Partikel-bezeichnung	Oberflächen-funktionalisierung	Dialyse	Durchmesser [nm]	Molmasse [$gmol^{-1}$]	ζ-Potential [199]
CW69G3	-	nein	67	-*	-*
CW82PA	Phenylalanin	nein	131	1000	-87
CW84N	-	nein	134	ca. 50000	-79
CW84ND	-	ja	116	-*	-70
CW84PAD	Phenylalanin	ja	102	-*	-90
CW84MePD	Methoxy-PEG2000	ja	126	-*	-56
CW95 N	Phenylalanin	ja	162	1000	-67
CW95ND	Phenylalanin	nein	256	-*	-50
CW101N	-	ja	57	-*	-61
CW101ND	-	nein	58	100000	-47
CW103MeP	Methoxy-PEG2000	nein	181	-*	-57
CW103MePD	Methoxy-PEG2000	ja	162	-*	-47

***Werte nicht vorhanden**

5.8.1 Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Konzentration

Um die für die Partikelaufnahme optimale Partikelkonzentration unter dem Sättigungsniveau zu finden und zu untersuchen, inwieweit die Partikelaufnahme in die Zelle von der Partikelkonzentration beeinflusst wird, wurden Hela- und Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen von Partikel CW82PA im Kulturmedium (0,75; 2,5; 7,5; 25 und 75 µg Feststoffgehalt pro mL Medium) 24 h inkubiert. Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS zeigen, dass die Aufnahmerate der Partikel bei HeLa- und Jurkat-Zellen mit der Konzentration der ins

Medium zugegebenen Poly(n-butylcyanacrylat)-Partikel (PBCA) CW82PA korreliert. HeLa-Zellen zeigen einen stärkeren Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität als Jurkat-Zellen (siehe Abbildung 70). Nach einer Zugabe der Partikel von 75 µg Feststoffgehalt pro ml Medium und einer Inkubationsdauer von 24 h war eine Sättigung noch nicht erreicht. Für die weiteren Experimente wurde immer 75 µg Feststoffgehalt pro mL Medium eingesetzt.

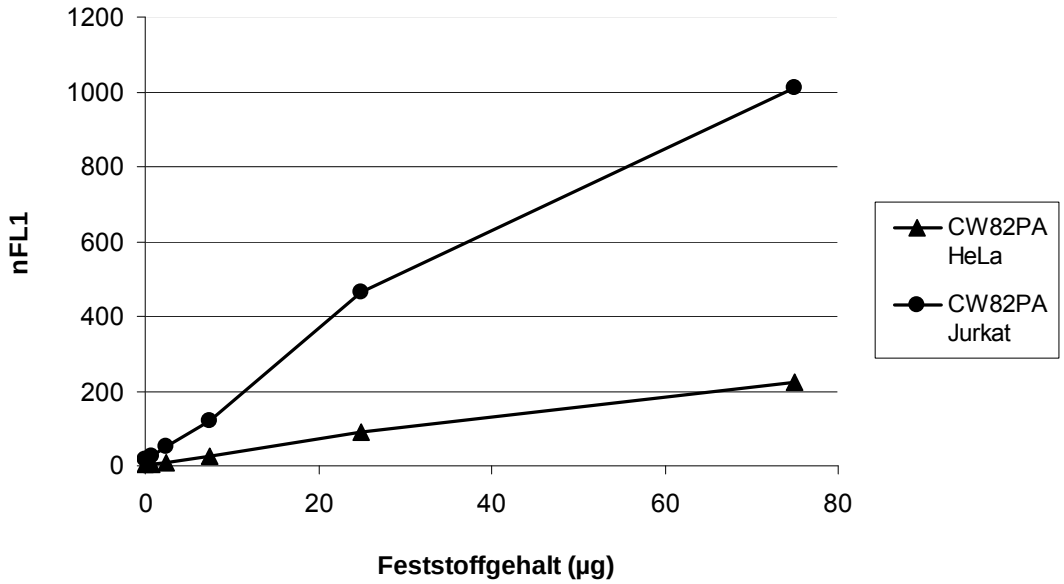


Abbildung 70: FACS-Analyse von HeLa-und Jurkat-Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0,75; 2,5; 7,5; 25 und 75 µg Feststoffgehalt pro mL Medium) des PBCA-Nanopartikels CW82PA.

5.8.2 Vitalitätsexperimente

Da PBCA-Partikel (bio)abbaubar sind, fallen Abbauprodukte wie n-Butanol und Poly(cyanacrylsäure) an. Diese Abbauprodukte zeigen jedoch zytotoxische Effekte [22, 228, 229]. So konnte die Arbeitsgruppe Müller 1996 für PBCA eine 100x höhere Zytotoxizität als für Polystyrol feststellen. Die Freisetzungsrate der Abbauprodukte hängt von der Kettenlänge des Polymers ab. Kürzere Ketten teilweise hydrolisierten PBCAs sind stärker hydrophil und lösen sich daher besser in wässrigem Medium als längere Ketten. Daher können kürzere Ketten leichter abgebaut werden.

5.8.2.1 FACS-Messungen

Um den Einfluss der molaren Masse von PBCA auf die Vitalität von Jurkat-Zellen zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Partikelchargen mit verschiedenen molaren Massen eingesetzt. Die Partikelchargen CW84N und CW95ND wurden dafür ausgewählt, da sie ein ähnliches Aufnahmeverhalten bei der Inkubation von Jurkat-Zellen zeigen (Abbildung 74 B und Abbildung 76 B). Jurkat-Zellen wurden 24 h mit den PBCA-Partikeln CW84N (Abbildung 71 A) mit langkettigeren Polymeren und CW95ND (Abbildung 71 B) mit kurzkettigeren Polymeren inkubiert. Um den Gehalt an lebendigen, apoptotischen und toten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen vor der FACS-Messung mit dem Vitalitätsmarker 7-AAD angefärbt. 7-AAD färbt apoptotische und tote Zellen, wodurch eine Unterscheidung gegenüber den lebenden Zellen ermöglicht wird. Die Partikel CW95ND besitzen auch Phenylalanin auf der Oberfläche, was die Partikelaufnahme jedoch nicht beeinflusst.
Die Apoptose der Zellen setzt nach Inkubation mit Partikel CW84N (Abbildung 71 A) erst zu einem späteren Zeitpunkt ein als bei Partikel CW95ND (Abbildung 71 B) ein. Das Maximum der Menge an toten und lebenden Zellen ist bei den Partikeln mit den kurzkettigerem Polymer höher und beträgt 70% für CW95ND und 55% für CW84N. Da tote Zellen einige Stunden nach Einsetzen der Apoptose in Fragmente zerfallen und im FACS nicht mehr als zelluläre Ereignisse sondern als Debris gezählt werden, während Zellen, die nicht apoptotisch sind als zelluläres Ereignis gezählt werden, kommt es zu einem Shift der 7-AAD positiven Fraktion versus die 7-AAD negativen Ereignisse. Für die meisten weiteren Experimente wurde aufgrund dieses Ergebnisses eine maximale Inkubationszeit von 240 min für die Aufnahmekinetikuntersuchungen gewählt.

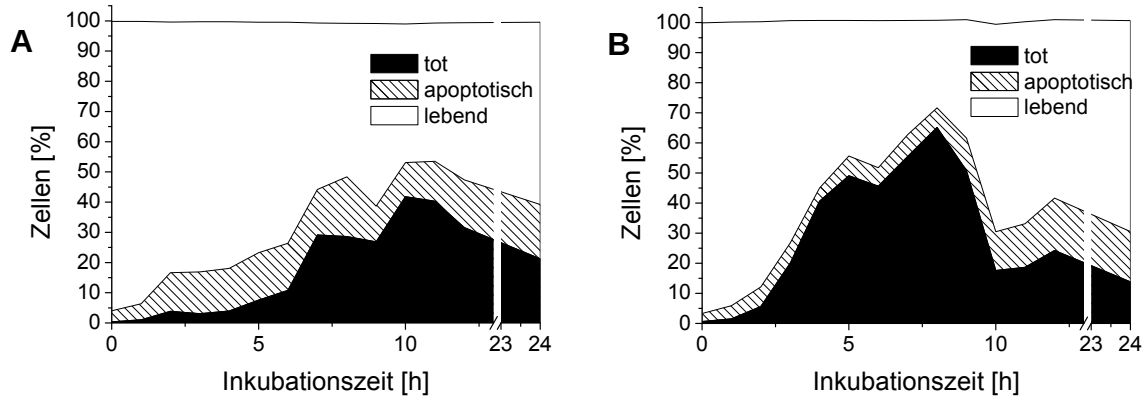


Abbildung 71 : Untersuchung der zellulären Vitalität mittels FACS nach 7-AAD-Färbung von Jurkat-Zellen, die zuvor 24 h mit den PBCA-Partikeln CW84 N (A) und CW95 ND (B) inkubiert wurden.

Zur Funktionalisierung der Partikel wurden auch Glycin-Gruppen an die Oberfläche von PBCA-Partikeln (CW69G3) gebunden. Zunächst sollten die Partikel hinsichtlich Zytotoxizität untersucht werden. Dazu wurden Jurkat-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 min; 5 min; 30 min; 1; 2; 4; 12 und 16 h) mit den Partikeln mit dem Vitalitätsmarker 7-AAD angefärbt und im FACS der prozentuale Anteil toter bzw. apoptotischer Zellen bestimmt (siehe Abbildung 72). Bei Jurkat-Zellen steigt die Zytotoxizität mit zunehmender Inkubationsdauer der Zellen mit PBCA-Partikeln an, insbesondere nach einer Inkubationsdauer von 4 h von ca. 8% toten und ca. 3% apoptotischen Zellen auf fast 60% tote und 20% apoptotische Zellen nach 720 und 960 min. Diese relativ früh einsetzende Zunahme apoptotischer/toter Zellen ist vergleichbar mit Partikel CW95ND, während sie bei Partikel CW84N erst später einsetzt. Dies könnte an der relativ ähnlichen molaren Masse von Partikel CW95ND und CW69G3 liegen.

Die mit der Zeit zunehmende Toxizität der Partikel könnte auf dem fortschreitenden Partikelabbau im Zytoplasma beruhen. Abbauprodukte wie Butanol oder Cyanacrylsäure sind zytotoxisch und könnten die Zellen schädigen.

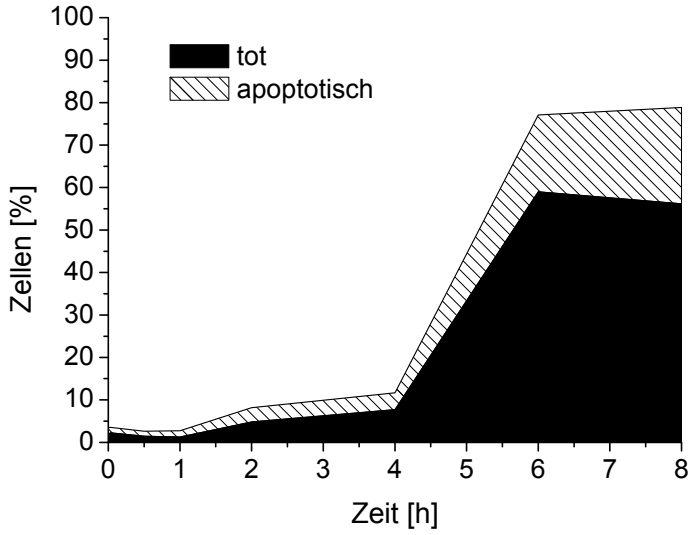


Abbildung 72: FACS-Messung von Jurkat-Zellen nach 0 min; 5 min; 30 min; 1; 2; 4; 12 und 16 h Inkubationsdauer mit dem PBCA-Partikel CW69G3. Tote und apoptotische Zellen wurden mittels des Vitalitätsmarkers 7-AAD angefärbt. Nach 4 h Partikelinkubation steigt die Fraktion der toten und apoptotischen Zellen beträchtlich an. Nach 16 h sind mehr als 80 % der Zellen tot oder apoptotisch.

5.8.2.2 CLSM-Analyse

Um die FACS-Daten zu überprüfen, wurden Jurkat-Zellen mit PBCA-Partikeln CW69G3 24 h inkubiert und dann im CLSM analysiert. Die Negativkontrolle zeigt vorwiegend vitale Zellen (Abbildung 73 A). Jurkat-Zellen zeigen nach 24-stündiger Markierung mit dem Partikel CW69G3 sehr viele Zellen, die eine Orangefärbung des Zytoplasmas aufweisen sowie Ausstülpungen der Zellmembran (Abbildung 73 B). Die Vitalität der Zellen kann aufgrund ihrer Anfärbung mit dem kommerziellen rot fluoreszierenden Farbstoff RH414 und ihrer Morphologie unterschieden werden. Bei vitalen Zellen färbt RH414 nur die äußere Zellmembran an. Sind die Zellen bereits am Absterben oder bereits abgestorben, so kann RH414 aufgrund der beschädigten Zellmembran sehr schnell ins Zytoplasma der Zellen migrieren, was zu einer Orangefärbung der Zellen führt. Die Orangefärbung kommt durch Überlagerung des roten Fluoreszenzsignals des Farbstoffes und der verstärkten grünen Autofluoreszenz nicht vitaler Zellen zustande. Außerdem sind bei stark geschädigten oder bereits abgestorbenen Zellen Ausstülpungen der Zellmembran (sogenannte Blebbs) zu erkennen. Mit dem Partikel CW69G3 markierte Zellen weisen alle Merkmale geschädigter Zellen auf. Die LSM-Analyse stimmt sehr gut mit den FACS-Daten überein (siehe Abbildung 72), wobei schon nach 16 h überwiegend apoptotische oder tote Zellen gefunden wurden.

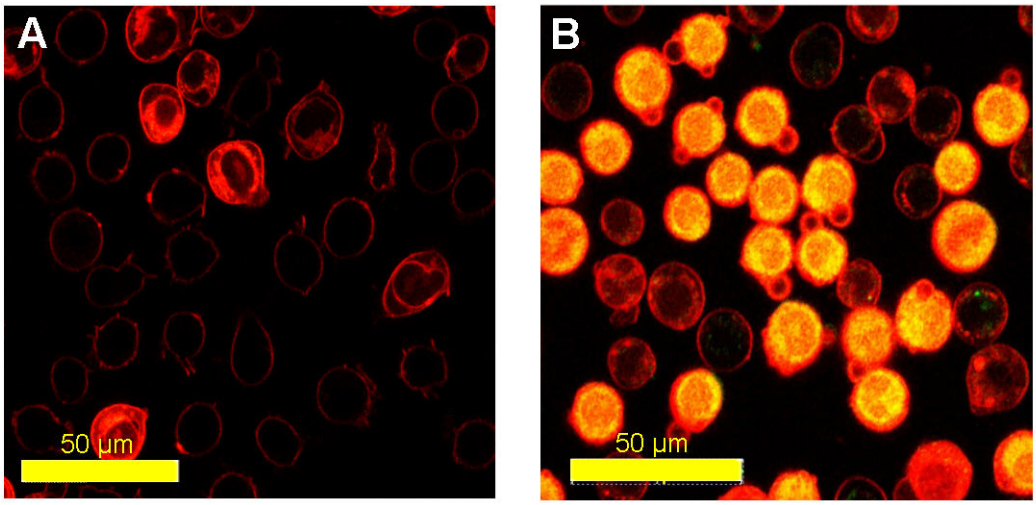


Abbildung 73: LSM von Jurkat-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Partikel CW69. (A) Negativkontrolle versus (B) Zellen, die mit PBCA-Partikeln behandelt wurden. Die meisten Zellen zeigen nach Inkubation mit Partikel CW69 eine orange Färbung (B). Es wurde der rot fluoreszierende Membranfarbstoff RH414 zur Visualisierung der Zellmembran und damit zur Unterscheidung extra- und intrazellulärer Partikelanreicherungen eingesetzt. Der Farbstoff wandert bei den abgestorbenen Zellen in das Zytoplasma.

5.8.3 Aufnahmekinetik

Aufgrund der hohen Zytotoxizität der PBCA-Partikel bei längeren Inkubationszeiten als 240 min (siehe Kapitel 5.8.2.1 FACS-Messungen), wurden für die Bestimmung der Aufnahmekinetiken 240 min als maximale Inkubationszeit gewählt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde im FACS nach 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240-minütiger Inkubation verschiedener PBCA-Partikel mit HeLa- und Jurkat-Zellen bestimmt. Die Aufnahme dialysierter und nicht dialysierter Partikel wurde verglichen, um den Einfluss von adsorbiertem SDS (stärker negative Ladung) zu untersuchen. Abbildung 74 zeigt die Aufnahmekinetik von HeLa-Zellen (Abbildung 74 A) und Jurkat-Zellen (Abbildung 74 B) nach 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240-minütiger Inkubation mit unfunktionalsiertem PBCA-Partikel CW84N (dialysiert) und CW84ND (nicht dialysiert). Während bei HeLa-Zellen nach 240 min ein Sättigungsniveau erreicht ist, zeigen Jurkat-Zellen zwischen 180 und 240 min einen steilen Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität, der bei 240 min noch keine Sättigung erreicht. Dialysierte Partikel zeigen eine etwas höhere Fluoreszenzintensität als undialysierte. Das Ergebnis zeigt, dass die höhere negative Ladung auf der Oberfläche

undialysierter Partikel keine positive Wirkung auf die Partikelaufnahme besitzt.
Bei HeLa-Zellen (Abbildung 75 A) sinkt die gemessene Fluoreszenz bei dialysierten und der undialysierten Partikeln nach 60 min, steigt aber nach 180-minütiger Inkubationsdauer wieder fast bis auf das nach 60 min erreichte Niveau an (Abbildung 75 A).
Die Partikel CW101 wurden ausgewählt, um die Partikelaufnahme hinsichtlich Partikelgröße miteinander zu vergleichen. In Abbildung 75 B zeigen Jurkat-Zellen bis zu einer 200-minütigen Inkubationsdauer dialysierter (CW101N) und undialysierter PBCA-Partikel (CW101ND) eine gleiche oder höhere gemessene Fluoreszenzintensität. Erst nach 180 min Inkubation sinkt die Kurve der undialysierten unterhalb die der dialysierten Partikel. Der Partikel CW101 ist unfunktionalisiert und unterscheidet sich von den anderen Partikeln (außer CW69 G3), die einen Durchmesser von mehr als 100 nm besitzen, hinsichtlich seines kleinen Partikeldurchmessers von 60 nm.
Die Partikel CW95 wurden zur Untersuchung der Partikelaufnahme hinsichtlich Funktionalisierung zu untersuchen. Abbildung 76 zeigt die Aufnahmekinetik der Phenylalanin-funktionalisierten Partikel CW95N (nicht dialysiert) und CW95ND (dialysiert) in HeLa-Zellen und Jurkat-Zellen (B). Nach Inkubation undialysierter Partikel ist die gemessene Fluoreszenzintensität bei Jurkat-Zellen bis zu dem Zeitpunkt der 180-minütigen Inkubationsdauer niedriger als die dialysierter Partikel (CW95N). Bei längeren Inkubationszeiten als 180 Minuten übertrifft sie die gemessene Fluoreszenzintensität dialysierter Partikel (A und B). Bei undialysierten ist im Gegensatz zu dialysierten Partikeln eine Sättigung noch nicht erreicht.
Bei mit PEG funktionalisierten PBCA-Partikeln (CW103MeP: nicht dialysiert und CW103MePD dialysiert) sind kaum Unterschiede in der gemessenen FL1 zwischen Aminosäure- und PEG- funktionalisierten Partikeln bei HeLa (Abbildung 77 A) und Jurkat-Zellen (Abbildung 77 B) zu erkennen. Bei HeLa-Zellen ist mit zunehmender Inkubationsdauer ein kontinuierlicher Anstieg der gemessenen FL1 zu beobachten. Bei Jurkat-Zellen wurde eine höhere FL1 gemessen (B), die zwischen 60-und 170-minütiger Inkubationsdauer stagniert.
In jedem der untersuchten Systeme steigt die gemessen Fluoreszenzintensität nach 10 minütiger Inkubationszeit an. Die intrazelluläre Partikelaufnahme korreliert mit der Inkubationsdauer. Nach 4-stündiger Inkubationsdauer wird bei HeLa- und Jurkat-Zellen die intrazelluläre Aufnahme noch nicht eingestellt, eine Sättigung ist noch

nicht erreicht.

Es sind jedoch Unterschiede zwischen den Zelllinien und den untersuchten Partikeln zu beobachten.

Der in Abbildung 74 A beobachtete kontinuierliche Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität bei HeLa-Zellen nach Inkubation mit CW84 bis 240 min steht in Kontrast zu den Partikeln CW101, bei denen die maximale Aufnahme bereits nach 60 minütiger Inkubationszeit erreicht ist. Nach 10 minütiger Inkubation erreichen Partikel CW101 eine höhere Fluoreszenzintensität als die Partikel CW84. Die anderen funktionalisierten Partikel CW95 und CW103 zeigen eine ähnliche Aufnahmekinetik wie Partikel CW84. Eine mögliche Erklärung für die Aufnahmekinetik von Partikel CW101 ist, dass die Partikel, die einen Durchmesser von 60 nm aufweisen, schneller von den Zellen aufgenommen werden als Partikel mit doppelter Größe. Die funktionalisierten Partikel unterscheiden sich in der Aufnahmekinetik nicht von den unfunktionalisierten Partikeln CW84. Die bei HeLa-Zellen beobachtete höhere Fluoreszenzintensität dialysierter Partikel CW84 verglichen mit undialysierten Partikeln könnte daran liegen, dass die negative Oberflächenladung dialysierter Partikel die Aufnahme der Partikel negativ beeinflusst. Für HeLa-Zellen lässt sich feststellen, dass das Aufnahmeverhalten durch die Partikelgröße beeinflusst werden kann. Außerdem scheint die Funktionalisierung der PBCA-Partikel nicht die Aufnahme der Partikel in die Zellen zu beeinflussen.

Auch bei Jurkat-Zellen zeigen dialysierte Partikel CW84 in den ersten 180 min eine erheblich höhere Aufnahme als undialysierte Partikel. Nicht dialysierte funktionalisierte Partikel CW95 und CW103 werden in einer ungefähr konstanten Rate internalisiert. Während die Phenylalanin-funktionalisierten Partikel CW95 ähnliche Aufnahmekinetiken wie die unfunktionalisierten Partikel zeigen, werden die MePEG-funktionalisierten Partikel CW103 viel langsamer und zu einem viel geringeren Ausmaß aufgenommen als alle anderen Partikel. Die Dialyse der Partikel beeinflusst nur die Aufnahmekinetik Phenylalanin-funktionalisierter Partikel CW95. Während die undialysierten Partikel mit während der Inkubationsdauer von 240 min nahezu konstant aufgenommen werden, werden dialysierte Partikel bereits in den ersten 60 min Inkubationsdauer sehr schnell aufgenommen. Nach den ersten 60 min kann nur noch eine geringe Aufnahme beobachtet werden, die sich nach 240 min auf dem gleichen Niveau befindet wie die nicht dialysierter Partikel. Da die

hydrodynamischen Durchmesser dialysierter Partikel signifikant kleiner sind als die undialysierter Partikel, könnten die Unterschiede der Aufnahme sowohl durch die Entfernung des SDS oder durch den Größenunterschied erklärt werden. Die unterschiedlichen Gehalte an SDS auf der Partikeloberfläche könnten also nur bei Jurkat-Zellen eine Rolle bei der Internalisation der Partikel spielen. Bei HeLa-Zellen scheint der SDS-Gehalt keinen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel zu haben. Bei Jurkat-Zellen zeigen PEG-funktionalisierte Partikel eine sehr moderate Aufnahmekinetik, wobei wesentlich niedrigere Fluoreszenzintensitäten gemessen werden als bei den anderen Partikeln. Das weist darauf hin, dass eine Oberflächenmodifikation durch PEG wichtig für eine Modulierung der Aufnahme in Jurkat-Zellen ist und dass dieser Effekt von der Zelllinie abhängt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Aufnahmeverhalten von Jurkat-Zellen durch Funktionalisierung der Partikel kontrolliert werden kann.

Die beobachteten Unterschiede der Aufnahmekinetiken könnten auf verschiedenen Aufnahmemechanismen für unterschiedlich große oder strukturierte Substrate beruhen. Ein Aufnahmemechanismus stellt die Clathrin-vermittelte Endozytose dar, bei der ein aus einem starren Käfig bestehendes Kompartiment aus Proteinen und der Zellmembran gebildet wird. Diese Kompartimente besitzen einen eng verteilten Durchmesser, so dass Partikel von 150 bis 200 nm Durchmesser aufgenommen werden können, wobei Partikel mit einem sehr großen Durchmesser eine langsamere Aufnahmekinetik zeigen [223, 230]. Damit könnte die schnelle Aufnamekinetik der Partikel CW101 zu erklären sein.

Aufgrund der Größe könnte der Partikel CW101 mit einem Durchmesser von 60 nm auch über Caveolae-Vesikel aufgenommen werden. Mittels Makropinozytose oder Phagozytose können auch größere Partikel im Größenbereich von Mikrometern aufgenommen werden [223].

Zusätzlich wurden längere Inkubationszeiten der dialysierten PBCA-Partikel CW84ND und CW95D untersucht, um die Sättigungszeit zu bestimmen. Jurkat-Zellen wurden 12 h mit den PBCA-Partikeln inkubiert. Das Experiment zeigt, dass der Hauptanstieg der Fluorestenzintensität innerhalb von 240 min nach der Partikelzugabe stattfindet (siehe Abbildung 78). Nach dieser Zeit wird ein Plateau erreicht, das einen Sättigungszustand anzeigt.

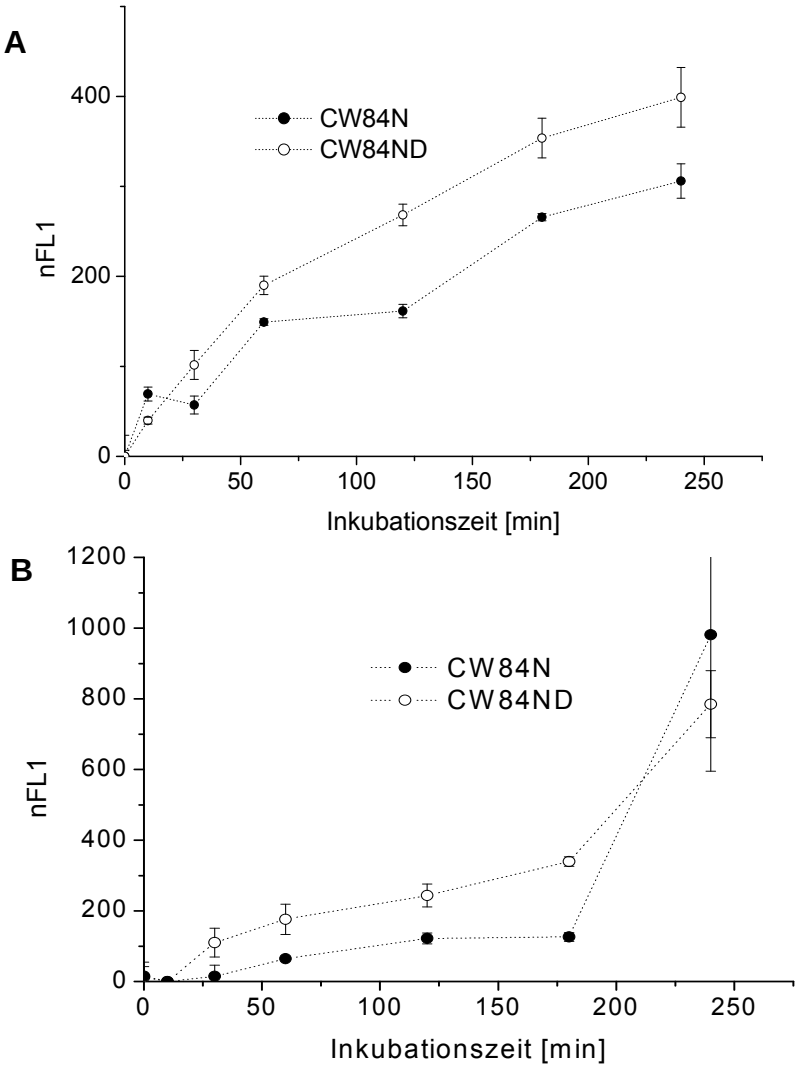


Abbildung 74: FACS-Analyse von HeLa (A) und Jurkat (B), die mit fluoreszierenden funktionalisiertem PBCA-Partikel CW84N und CW84ND 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240 min inkubiert wurden. Es ist ein Unterschied zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität bei dialysierten (CW84N) und undialysierten (CW84ND) Partikeln zu erkennen.

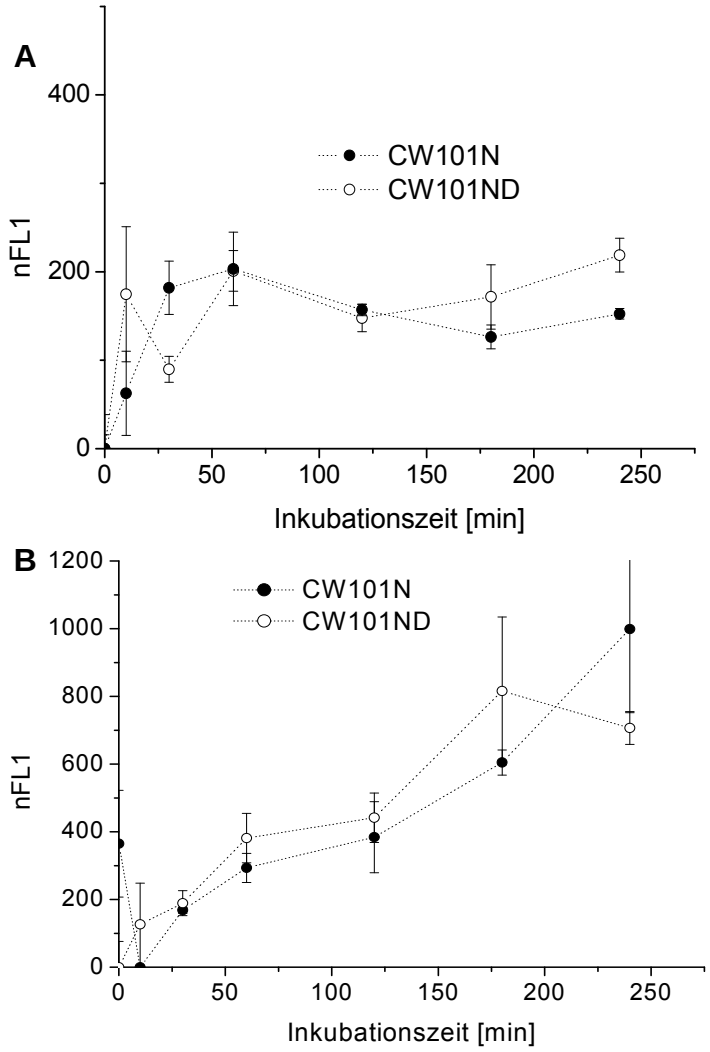


Abbildung 75: Nach Inkubation von HeLa (A) und Jurkat (B) mit fluoreszierendem PBCA-Partikel CW101N und CW101ND für 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240 min wurden FACS Messungen durchgeführt.

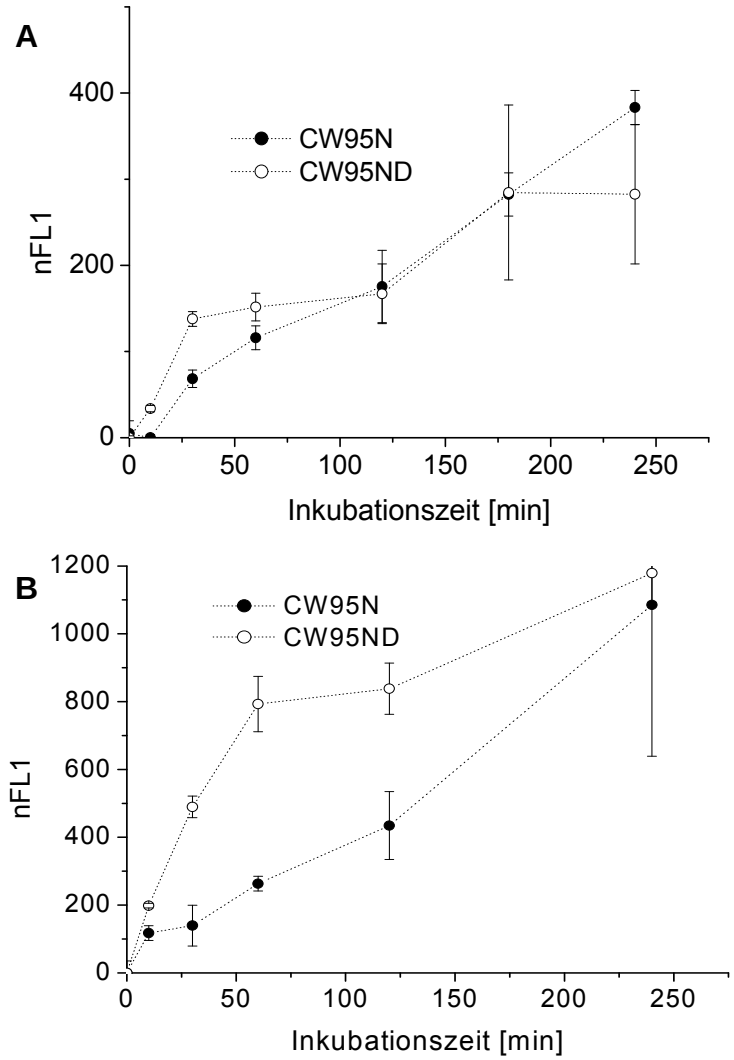


Abbildung 76: FACS-Messungen von HeLa (A) und Jurkat (B), die mit fluoreszierenden funktionalisiertem PBCA-Partikel CW95N und CW95ND 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240 min inkubiert wurden.

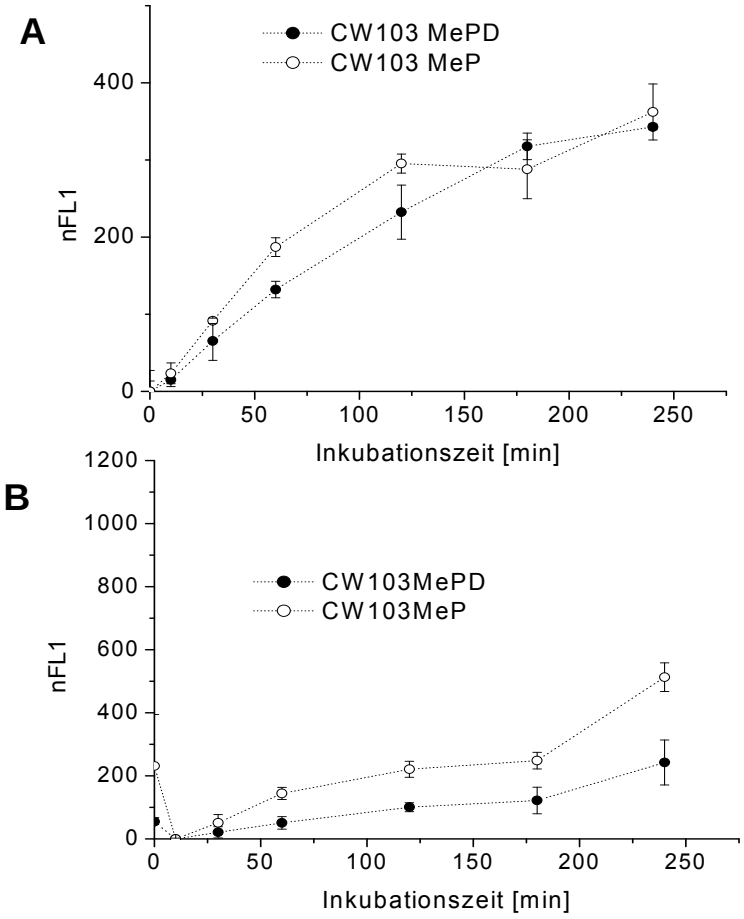


Abbildung 77: FACS-Messungen von HeLa (A) und Jurkat (B), die mit den fluoreszierenden aminosäure- und PEG- funktionalisierten PBCA-Partikel 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 240 min lang inkubiert wurden.

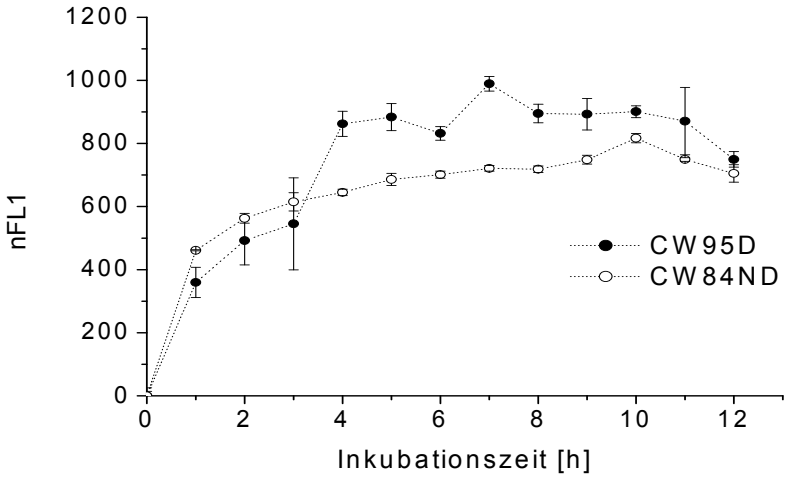


Abbildung 78: FACS-Messung von Jurkat-Zellen nach Inkubation mit undialysierten PBCA-Partikeln CW84N und CW95D. Die Kurve zeigt einen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 4 h Inkubationszeit.

5.8.4 Lokalisation der Partikel mittels CLSM

Um unterscheiden zu können, ob die Signale im FACS durch extrazelluläre Partikelanlagerungen an der Zellmembran oder intrazelluläre, im Zytoplasma lokalisierte Partikel erzeugt wurden, wurden Jurkat-, HeLa-Zellen und MSCs nach 4 stündiger Inkubation mit PBCA-Partikeln unter dem CLSM betrachtet. Wie bereits erwähnt, stellen 4 h Inkubationszeit einen Kompromiss zwischen der maximalen Aufnahme und einer akzeptablen Apoptoserate dar. Zur CLSM-Analyse wurde die Zellmembran mit dem Fluoreszenzfarbstoff RH414 angefärbt. Die Negativkontrollen zeigen keine grünen Fluoreszenzsignale (Abbildung 79 A, Abbildung 80 A und Abbildung 81 A). Es wurden bei den untersuchten Partikeln (siehe Abbildung 79, Abbildung 80 und Abbildung 81 B) unfunktionalisierte Partikel, C) Phenylalanin-funktionalisierte Partikel und D) MePEG-funktionalisierte Partikel in allen untersuchten Zelllinien grüne Fluoreszenzsignale in ähnlicher Signalintensität in den Zellen gefunden. Die intrazelluläre Partikelverteilung ist in allen Zelllinien gleich und scheint weder vom jeweiligen Zelltyp noch von der Funktionalisierung der Partikel abzuhängen. Es waren keine extrazellulären Partikelanlagerungen an die Zellmembran zu erkennen. Die grünen Fluoreszenzsignale sind über das gesamte Zytoplasma verteilt. Dabei dürften die größeren Signalpunkte Partikelcluster darstellen. Diese treten in manchen Bereichen in der Zelle gehäuft auf. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Partikelanreicherungen in membranumhüllten Zellkompartimenten, wie dies bereits für Polystyrol und Polyisoprenpartikel gezeigt wurde (Kapitel TEM 5.2.3; Kapitel Lokalisation mittels TEM 5.7.5). Das diffuse grüne Fluoreszenzsignal zeigt ein gleichmäßiges Verteilungsmuster im Zytoplasma. Es ist unklar, ob es sich hier um einzelne Partikel oder den Fluoreszenzfarbstoff PMI, der frei im Zytoplasma vorliegt, handelt oder um beides. Eine Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffes aus den Partikeln ist aufgrund deren Bioabbaubarkeit, die bereits in den ersten Stunden einsetzt, möglich. Im Zellkern sind keine Partikel zu erkennen. Eine genauere Lokalisierung der Partikel könnten TEM-Analysen ermöglichen. Bisher ist es aufgrund der Eigenschaft der Partikel, Polymerfilme auszubilden, nicht gelungen, TEM-Aufnahmen von den PBCA-Partikeln im Zytoplasma zu machen, um eine genaue Lokalisierung der Partikel im Zytoplasma vornehmen zu können. Die intrazelluläre Partikelverteilung ist für alle eingesetzten Zelllinien ähnlich und wird von keiner der Oberflächenmodifikationen der Partikel verändert (Abbildung 79, Abbildung 80 und Abbildung 81).

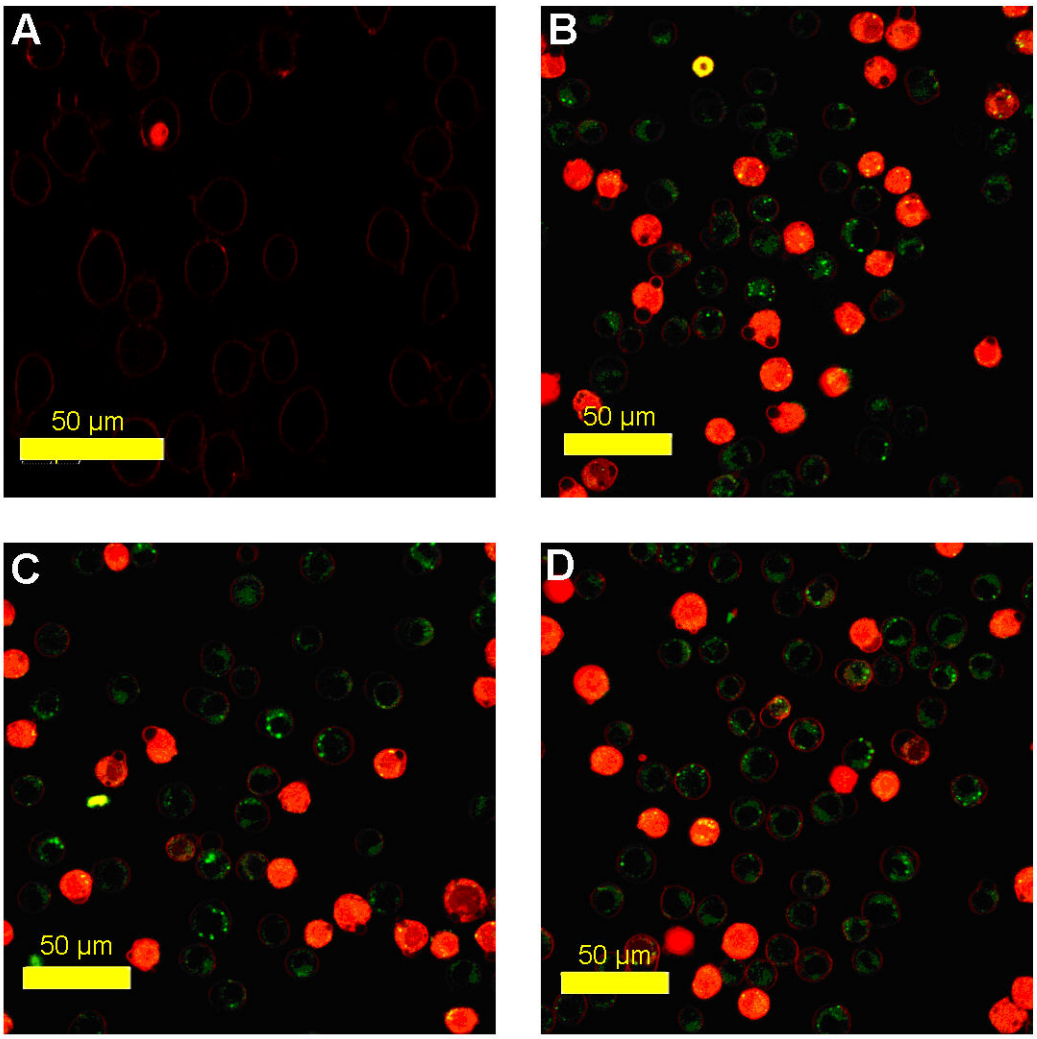


Abbildung 79: CLSM-Analyse von Jurkat-Zellen, (A) Negativkontrolle, (B) Partikel CW84ND ohne Funktionalisierung, (C) Partikel CW84PAD (Phenylalanin, dialysiert) mit Aminosäuregruppen auf der Oberfläche und (D) Partikel CW84 mit MePEG (Methoxy-Polyethylenglykol) auf der Oberfläche.

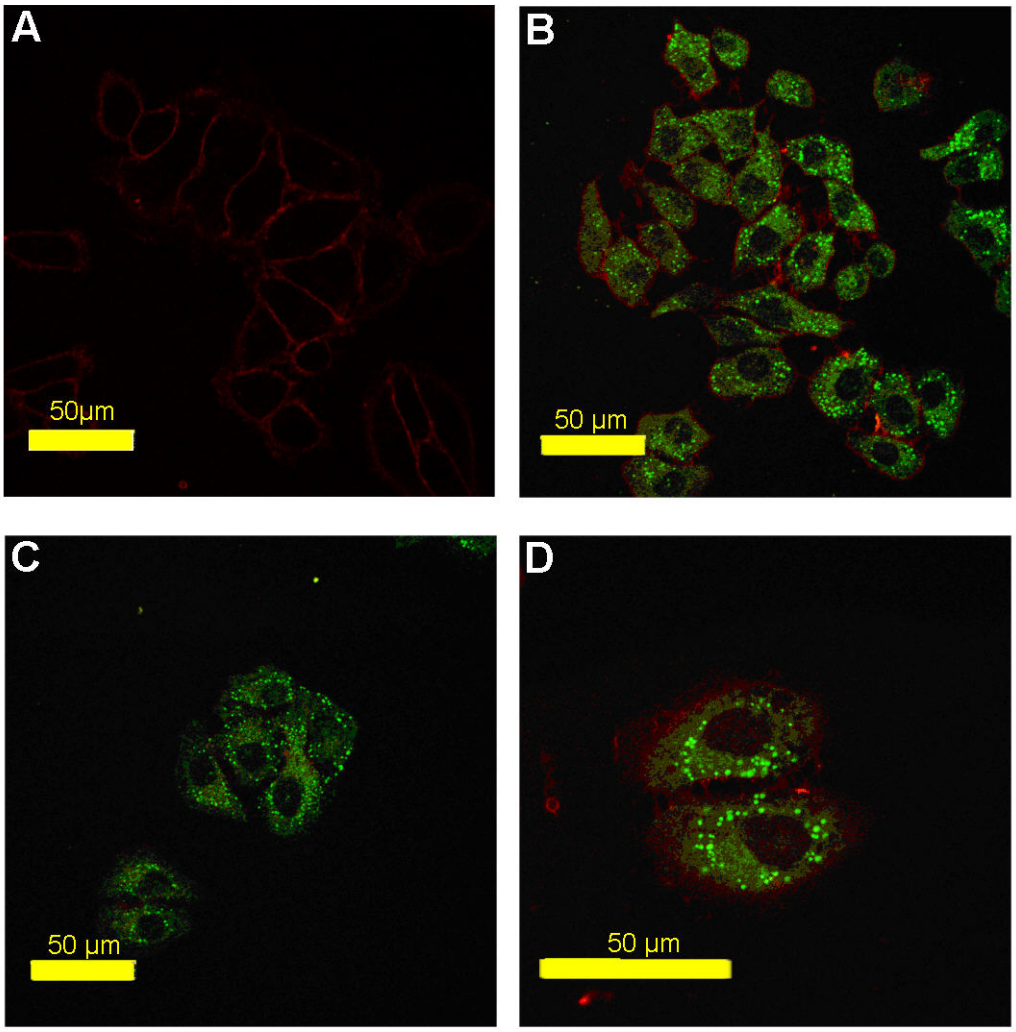


Abbildung 80: CLSM-Analyse der Negativkontrolle von HeLa (A), nach 4 Stunden Inkubation mit unfunktionalisiertem Partikel CW84ND (B), Phenylalanin-funktionalisiertem Partikel CW84PAD (C) sowie MePEG funktionalisiertem Partikel CW84MePD (D). Auch hier wurde die Zellmembran mit dem kommerziellen fluoreszierenden Farbstoff RH414 zur Visualisierung der Zellen (roter Kanal 1) angefärbt. Die fluoreszierenden Partikel werden im grünen Kanal detektiert.

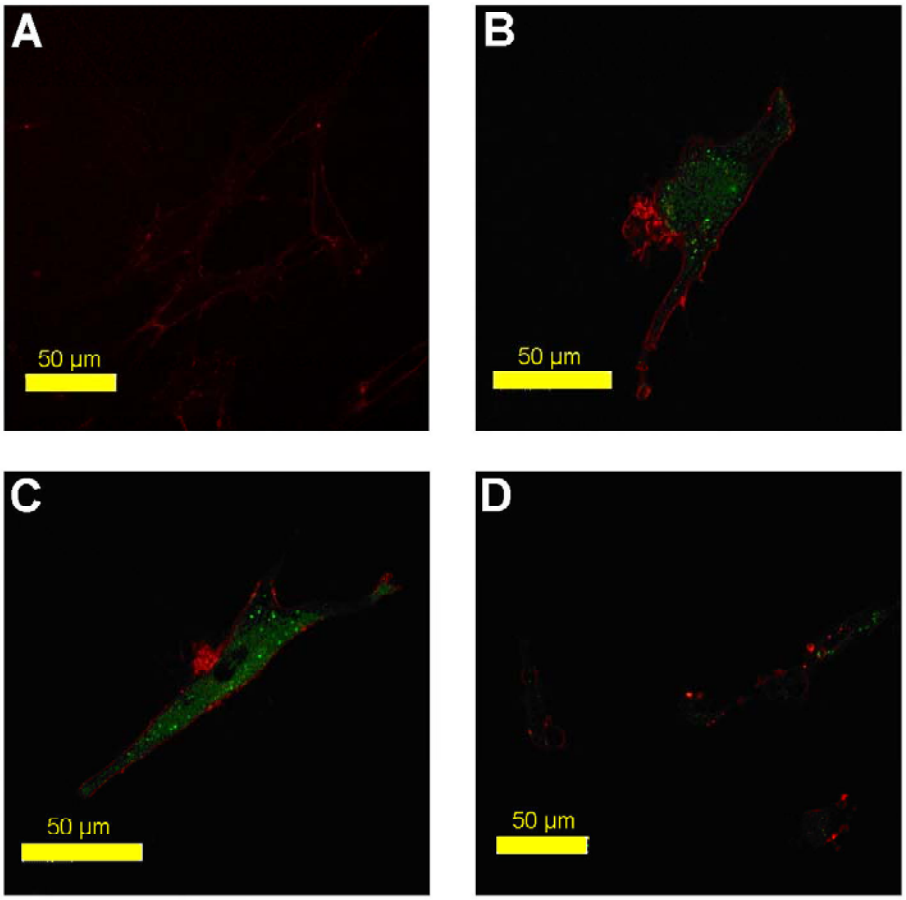


Abbildung 81: CLSM-Aufnahme von MSCs ohne Zugabe von Nanopartikeln (A), nach Zugabe von unfunktionalisiertem Partikel CW84ND (B), nach Zugabe von Phenylalanin funktionalisiertem Partikel CW84PAD (C) und MePEG funktionalisiertem Partikel CW84MePD (D).

5.9 Poly-L-Lactid-Partikel

Da die PBCA-Partikel bei längeren Inkubationszeiten als 4 h eine hohe Zytotoxizität aufwiesen, sind sie für Langzeitanwendungen nicht geeignet. Daher wurden andere bioabbaubare Polymere wie Poly-L-Lactid hinsichtlich ihrer Aufnahme in verschiedene Zelllinien untersucht. Poly-L-Lactid-Nanopartikel wurden von Dr. Anna Musyanovych am Institut für Organische Chemie III an der Universität Ulm synthetisiert. Diese besitzen negative Oberflächenladung und einen Partikeldurchmesser von 245 nm (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Poly-L-Lactid-Nanopartikel.

Partikelbezeichnung	Zetapotential [199]	Durchmesser [nm]
AM-PLL-PM	-22	245

5.9.1 Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS

Um die Partikel hinsichtlich Aufnahmerate in unterschiedlichen Zelllinien in ersten Versuchsreihen zu charakterisieren, wurden zunächst FACS-Analysen durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation von HeLa-Zellen, MSCs, KG1a- und Jurkat-Zellen (Abbildung 82 D) mit fluoreszierenden Poly-L-Lactidpartikeln AM-PLL-PM wurde im FACS die relative Fluoreszenzintensität gemessen. Bei allen untersuchten Zelllinien wurde nach Inkubation mit Partikel AM-PLL-PM eine im Gegensatz zur Negativkontrolle (unbehandelt) signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 82 A HeLa, B MSC, C KG1a und D Jurkat). Die Poly-L-Lactid-Partikel erhöhen die Aufnahme in verschiedene Zelllinien. Selbst Suspensionszelllinien wie Jurkat- und KG1a-Zellen zeigen hohe gemessene Fluoreszenzintensitäten, was auch hier auf eine gute Partikelaufnahme hindeutet. Es kann jedoch mittels FACS-Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um vorwiegend um extrazelluläre Partikelanlagerungen handeln könnte. Um genaue Aussagen über die Lokalisation der Partikel in den Zellen oder eventuelle extrazelluläre Partikelanlagerungen an die Zellmembran machen zu können, wurden LSM- und TEM-Analysen durchgeführt.

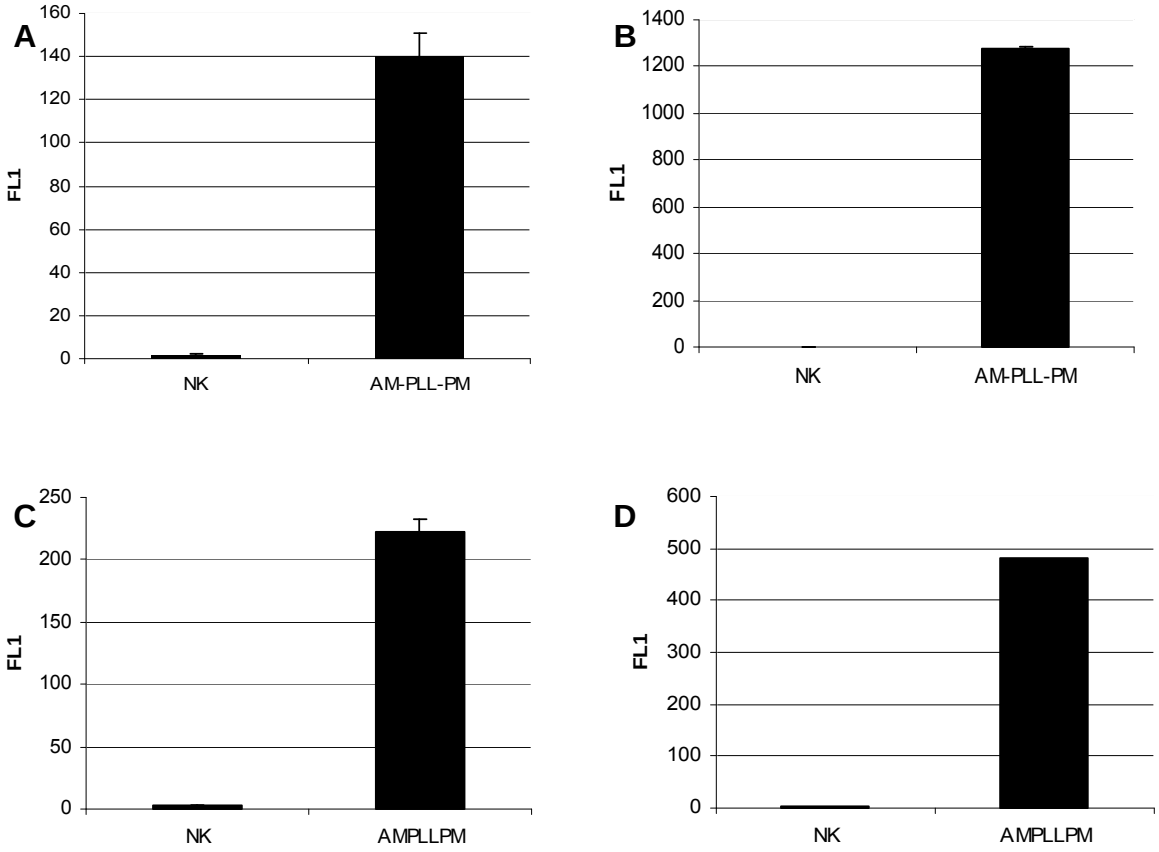


Abbildung 82: Fluoreszenzintensitätsmessungen am FACS von MSC (A), Hela (B)-, Jurkat (C)- und KG1a-Zellen (D) nach 24-stündiger Inkubation mit den fluoreszierenden Poly-L-Lactidpartikeln AM-PLL-PM. Die FL1 ist bei allen Zelllinien verglichen mit der Negativkontrolle stark erhöht.

5.9.2 Lokalisation der Partikel mittels CLSM

Um die Partikelverteilung in den Zellen sowie eventuell vorhandene Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zelllinien nach Inkubation mit den Poly-L-Lactidpartikeln unter dem CLSM betrachtet. Bei HeLa-, Jurkat- und KG1a- Zellen sind im CLSM nach 24 stündiger Inkubation mit den fluoreszierenden Poly-L-Lactidpartikeln AM-PLL-PM grüne Fluoreszenzsignale im Bereich des Zytoplasmas zu erkennen (siehe Abbildung 83 B) HeLa, D) KG1a und F) Jurkat). Diese fehlen bei der Negativkontrolle und deuten auf eine Partikelaufnahme in die Zellen hin. Die intensiveren grünen Fluoreszenzsignale sind ungleichmäßig über das Zytoplasma verteilt und stellen wahrscheinlich Partikelcluster in Endosomen dar, während die feinen grünen Signale eine homogene Verteilung im Zytoplasma zeigen. Damit ähnelt die Verteilung der PBCA-

Partikel (Kapitel Lokalisation der Partikel mittels CLSM). Hier könnte es sich um einzelne Partikel handeln, wie es für Polyisoprenpartikel bereits mittels TEM-Analyse gezeigt wurde (5.7.5).

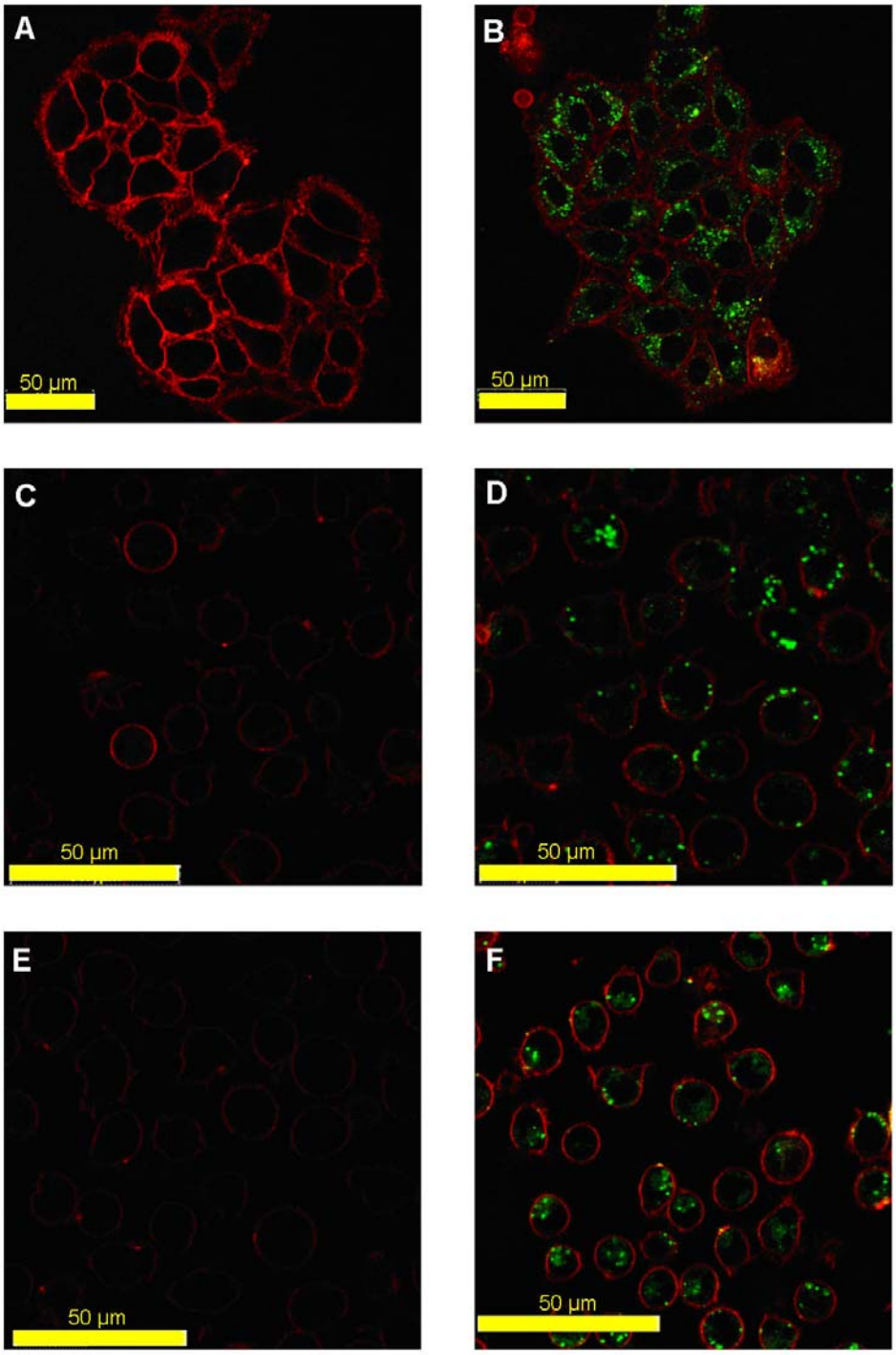


Abbildung 83: CLSM-Bilder von HeLa (A, B), KG1a (C, D) und Jurkat (E, F) nach 24 stündiger Inkubation mit den Poly-L-Lactidpartikeln AM-PLL-PM. Die Negativkontrolle (A, C und D) zeigt bei allen Zelllinien keine grünen Fluoreszenzsignale, während die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Poly-L-Lactidpartikeln grüne Fluoreszenzsignale aufweisen.

5.9.3 Lokalisation mittels TEM

Der Verbleib der Partikel im Zytoplasma sollte nun mit dem hochauflösenderen TEM untersucht werden. Die TEM-Aufnahmen wurden von Julia Schmitz-Wienke durchgeführt [Paper in Vorbereitung]. Die Abbildung zeigt helle eiförmig erscheinende Bereiche in membranumhüllten Zellkompartimenten und extrazelluläre an der Zellmembran, wobei es sich um die Poly-L-Lactid-Partikel AM-PLL-PM handeln dürfte, da die Anordnung partikelcharakteristisch ist und die Partikel im Elektronenstrahl wahrscheinlich instabil sind. Nach 24-stündiger Inkubation sind in HeLa-Zellen sehr viele Bereiche im Zytoplasma zu erkennen (Abbildung 84 A und B), an denen sich Partikel befanden, während bei Jurkat-Zellen selbst bei Einsatz des Transfektionsmittels PLL weniger intrazellulär lokalisierte Bereiche zu finden sind (Abbildung 84 C). Damit kann bei Suspensionszelllinien wie Jurkat-Zellen nicht auf ein Transfektionsmittel verzichtet werden.

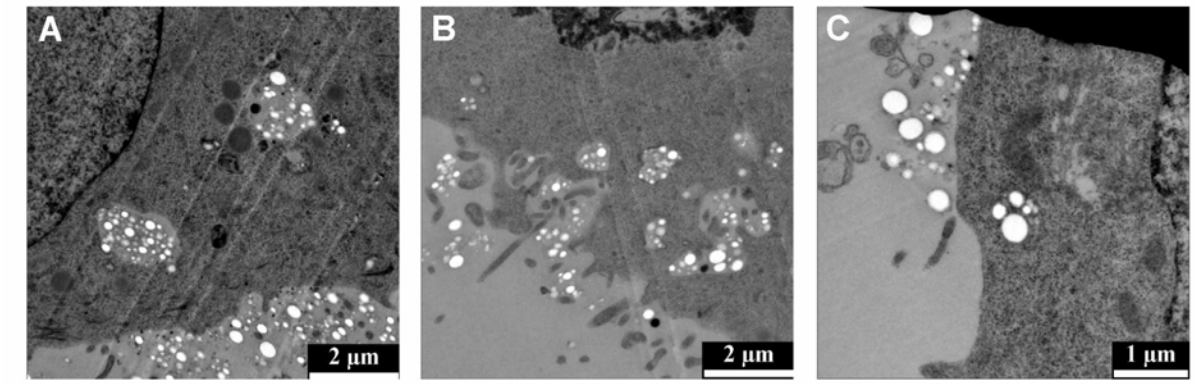


Abbildung 84: TEM-Analyse von HeLa-Zellen **(A, B)** und Jurkat-Zellen **(C)** nach 24-stündiger Inkubation mit Poly-L-Lactid-Partikeln AMPLLPM. Die Partikel erscheinen als helle eiförmige Bereiche in Zellkompartimenten, die Endosomen ähneln. Bei den Jurkat-Zellen wurde das Transfektionsmittel PLL zusätzlich zu den Poly-L-Lactidpartikeln ins Medium gegeben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Bei dem käuflichen Kontrastmittel Resovist® konnte ein Zusammenhang zwischen der Kontrastmittelkonzentration, der Aufnahme und der Partikelkoagulation beschrieben werden. Des Weiteren konnten Unterschiede in der Effizienz der Zellmarkierung von HeLa-Zellen und MSCs gezeigt werden. Es war möglich, Zellen mit Resovist® auch ohne Einsatz eines Transfektionsmittels zu markieren, was bei Feridex© nur in 10-facher Konzentration mit wesentlich geringerer Aufnahmerate als bei Resovist® gelang. Im Aufbau unterscheidet sich Resovist® von Feridex©, denn im Gegensatz zu Feridex besitzt Resovist® statt einer einfachen Dextranhülle eine Carboxyldextranhülle. Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Reihe von Polymerpartikeln mit ansteigendem Gehalt an Carboxylgruppen auf der Oberfläche synthetisiert (Modellpartikel). In Zellexperimenten konnte eine Zunahme der Partikelaufnahme in die Zellen mit steigender Anzahl an Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche festgestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass Partikel mit einem Durchmesser von unter einem Mikrometer, die mit kationischen oder anionischen Gruppen an ihrer Oberfläche funktionalisiert waren, die Partikelaufnahme in HeLa-Zellen und MSCs erhöhen. Insbesondere kationische Gruppen wie NH_3-Gruppen an der Oberfläche von Partikeln führen zu einer vermehrten Partikelaufnahme in die Zellen [231]. Dabei kann auf die Verwendung eines toxischen Transfektionsmittels verzichtet werden. Bei der Markierung von HeLa-Zellen und MSCs erfolgte eine Aufnahme der Partikel in intrazelluläre Kompartimente, die Endosomen ähneln, während eine freie Verteilung im Zytoplasma nicht festgestellt werden konnte. Im Zellkern und den Mitochondrien wurden ebenfalls keine Partikel gefunden. Die Partikelanhäufungen in den Zellen waren nicht homogen im Zytoplasma verteilt. Bei Jurkat-und KG1a-Zellen waren die Partikel vorwiegend extrazellulär in Clustern an die Zellmembran angelagert, die sich aus Partikeln, Microvilli und elektronendichtem Material zusammensetzten. Die Anlagerung der Partikel als erster Schritt der Endozytose, scheint hauptsächlich durch die Oberflächenladung der Partikel beeinflusst zu werden. Die Unterschiede in der Aufnahme könnten durch die unterschiedlichen endozytotischen/pinozytotischen Eigenschaften der Zelllinien HeLa, MSC, KG1a und Jurkat erklärt werden.

Eine Aminofunktionalisierung der Polystyrolnanopartikel erhöht die Aufnahmerate in verschiedene Zelllinien. Insbesondere Lysin eignete sich aufgrund der positiven Ladung für die Funktionalisierung. Superparamagnetische Partikel mit kovalent an die Partikeloberfläche gebundenem Lysin, die für MRT-Anwendungen interessant

sind, waren hinsichtlich der Aufnahmerate in Zellen gegenüber unfunktionalisierten Partikeln überlegen. Selbst bei Zugabe des Transfektionsmittels PLL, das sich adsorptiv an die Partikeloberfläche anlagert, wurde keine so hohe Partikelaufnahme erreicht wie bei den Partikeln mit kovalent gebundenen Lysingruppen auf der Oberfläche. Derartig funktionalisierte Eisenoxidnanopartikel besitzen den Vorteil, dass sie ohne Verwendung eines toxischen, nicht für klinische Anwendungen zugelassenen Transfektionsmittels Zellen mit einer höheren Effektivität markieren als unfunktionalisierte Partikel in Kombination mit dem Transfektionsagenz PLL. Außerdem sind sie den kommerziellen Kontrastmitteln Feridex und Resovist aufgrund der höheren Stabilität der Polystyrolhülle bei Langzeitanwendungen überlegen.

PI-Partikel wurden von allen Zelllinien besonders gut aufgenommen. Im CLSM waren die Signale der fluoreszierenden Partikel diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt. Diese könnten einzelne Partikel darstellen oder aber PMI-Moleküle, die aus den Partikeln heraus diffundiert waren. Die Partikel können zur Zellmarkierung für *in vitro* Versuche eingesetzt werden. Da die Partikel nicht von den Zellen abgebaut werden können, sind sie im Besonderen für Langzeitanwendungen geeignet. Dabei sollten ausdifferenzierte, sich nicht mehr teilende Zellen eingesetzt werden, um Signalabnahme aufgrund der Zellteilung zu vermeiden.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit auch gelungen, bioabbaubare und biokompatible Partikel aus PBCA und Poly-L-actid intrazellulär in MSCs, HeLa- und Jurkat-Zellen nachzuweisen. Durch Verkapselung von Medikamenten in derartige Polymerpartikel sollen Krankheiten gezielt bekämpft werden. Es ist auf diese Weise zum Beispiel auch möglich, DNA oder RNA in Zellen zu schleusen, um deren Wirkmechanismus und Interaktion in der Zelle besser verstehen zu können sowie gentherapeutische Ansätze zu entwickeln.

7 Outlook and summary

Concerning the commercially available contrast agent Resovist® a correlation between the concentration of contrast agent, cellular uptake and particle coagulation was observed. Furthermore, differences concerning the efficiency of cell labeling of HeLa and MSCs could be shown. Labeling of cells with Resovist® was possible without the use of a transfection agent which could not be shown for Feridex© in the same concentration. Increasing the concentration of Feridex© to 10-fold resulted in cell labeling, but compared with the uptake rate of Resovist® it was significantly lower. There is a difference concerning the structure of Resovist® and Feridex©. In contrast to Feridex©, which consists of a dextrane shell, Resovist® consists of a carboxy dextrane shell. Because of this observation a series of polymer particles with increasing amount of carboxy groups on the surface was synthesized. Cell experiments showed an increase of the particle uptake with increasing amount of carboxy groups on the particle surface.

It was proved that particles with a diameter of less than 1 micrometer functionalized with cationic or anionic groups on the surface increase particle uptake in HeLa and MSCs. Particularly cationic groups like amino-groups on the particle surface lead to increased intracellular particle without the use of a transfection agent [231]. Labeling of HeLa and MSCs results in an uptake of the particles in intracellular compartments resembling endosomes. Free distribution of single particles or particle clusters in the cytoplasm was not observed. No particles were found in the cell core or the mitochondria. Particle accumulations were not homogeneously distributed among the cytoplasm. Concerning Jurkat and KG1a the particles were predominantly attached to the cell membrane in clusters composed of particles, microvilli and electron dense material. The first step of endozytosis, the attachment of the particles, seems to be influenced mainly by the surface charge of the particles. Differences concerning intracellular uptake could be explained by the different endozytotic/pinozytotic properties of the cell lines HeLa, MSC, KG1a and Jurkat.

Aminofunctionalization of the polystyrene nanoparticles increases uptake rate in different cell lines. Particularly lysine is suitable for functionalization due to the positive charge. Superparamagnetic particles, relevant for MRT applications, with lysine covalently coupled on the particle surface evidenced higher uptake rate compared to unfunctionalized particles. Adsorptive attachment of the transfection agent PLL results in lower uptake rates compared to particles with covalently coupled lysine groups on the surface. Such functionalized iron oxide nanoparticles possess the advantage of labeling cells more efficiently without the use of a toxic transfection

agent which is not approved for biomedical applications than unfunctionalized particles with the use of PLL. Furthermore, because of the higher stability they are superior to the commercial available contrast agents Resovist® and Feridex© concerning long term applications.

PI-particles were uptaken by all cell lines very efficiently. CLSM analysis showed diffuse distributions of the signals all over the cytoplasm. These could constitute single particles or PMI molecules diffused from the particles. The particles could be used for *in vitro* experiments. As the particles cannot be degraded by the cells they are especially suited for long term applications. Thereby completely differentiated non-dividing cells should be used to avoid signal loss as a result of cell division.

Within the scope of this study it was also possible to detect biodegradable and biocompatible PBCA and poly-L-lactide particles intracellularly in MSCs, HeLa and Jurkat. By encapsulating of drugs in these polymer particles diseases should be combated systematically. Thereby it is possible to insert DNA and RNA into cells to understand their effect and interaction in the cell as well as to develop gene therapeutic approaches.

8 Literatur

1. Feynman, R., *There is a plenty of room at the bottom.* Rede, 1959.2. Taniguchi, N., *On the Basic Concept of Nano-Technology.* Proc. Intl. Conf. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974.
3. Drexler, E., ed. *Engines of creation*. 1986, Anchor Books.
4. Port, R.E., M.V. Knopp, and G. Brix, *Dynamic contrast-enhanced MRI using Gd-DTPA: interindividual variability of the arterial input function and consequences for the assessment of kinetics in tumors.* Magn Reson Med., 2001. **45**(6): p. 1030-8.
5. Fallon, M.S., et al., *A physiologically-based pharmacokinetic model of drug detoxification by nanoparticles.* J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2004. **31**(5): p. 381-400.
6. Fattal, E., et al., *Tratment of Experimental Salmonellosis in Mice with Ampicillin-Bound Nanoparticles.* Antimicrobal Agents and Chemotherapy, 1989. **33**(9): p. 1540-1543.
7. Bender, A.R., et al., *Efficiency of Nanoparticles as a Carrier System for Antiviral Agents in Human Immunodeficiency Virus-Infected Human Monocytes/Macrophages In Vitro.* Antimicrobal Agents and Chemotherapy, 1996. **40**(6): p. 1467-1471.
8. Gupta, A.K. and A.S. Curtis, *Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture.* J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 493-6.
9. Maesaki, S., *Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents.* Curr Pharm Des, 2002. **8**(6): p. 433-40.
10. Chawla, J.S. and M.M. Amiji, *Biodegradable poly(epsilon -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen.* Int J Pharm, 2002. **249**(1-2): p. 127-38.
11. Sachdeva, M.S., *Drug targeting systems for cancer chemotherapy.* Expert Opin Investig Drugs., 1998. **7**(11): p. 1849-64.
12. Jain, K.K., *Nanotechnology-based drug delivery for cancer.* Technol Cancer Res Treat., 2005. **4**(4): p. 407-16.
13. Kukowska-Latallo, J.F., et al., *Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer.* Cancer Res., 2005. **65**(12): p. 5317-24.
14. Zangemeister-Wittke, U., *Antibodies for targeted cancer therapy -- technical aspects and clinical perspectives.* Pathobiology., 2005. **72**(6): p. 279-86.
15. Damge, C., et al., *New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier.* Diabetes, 1988. **37**(2): p. 246-251.
16. Jiao, Y., et al., *In Vitro and In Vivo Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits.* Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-235.
17. Gurny, R., et al., *Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs.* Drug Development and Industrial Pharmacy, 1981. **7**(1): p. 1-25.
18. Couvreur, P., *Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carrier.* CRC Critical Revievs in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1988. **5**(1): p. 1-17.
19. Gref, R., et al., *Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres.*

Science, 1994. **263**: p. 1600-1603.
20. Göpferich, A., *Polymer Degradation and Erosion: Mechanisms and Applications.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 1996. **42**(1): p. 1-11.
21. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**: p. 65-81.
22. Vauthier, C., et al., *Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications.* Adv Drug Deliv Rev., 2003. **55**(4): p. 519-48.
23. Shen, L.F., et al., *Liver targeting and the delayed drug release of the nanoparticles of adriamycin polybutylcyanoacrylate in mice.* Chin Med J (Engl). 2006. **119**(15): p. 1287-93.
24. Guo, B., J. Yuan, and Q. Gao, *Preparation and characterization of pH sensitive comb-shaped chitosan material for the controlled release of coenzyme A.* J Mater Sci Mater Med, 2006. **30**: p. 30.
25. Shenoy, D., et al., *Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations.* Mol Pharm., 2005. **2**(5): p. 357-66.
26. Schauer, R., *Sialic acids and their role as biological masks.* Trends in Biochemical Sciences, 1985. **10**(9): p. 357-360.
27. Torchilin, V.P. and V.S. Trubetskoy, *Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?* Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**: p. 141-155.
28. Passirani, C., et al., *Long-Circulating Nanoparticles Bearing Heparin or Dextran Covalently Bound to Poly(Methyl Methacrylate).* Pharmaceutical Research, 1998. **15**(7): p. 1046-1050.
29. Peracchia, M.T., et al., *Pegylated nanoparticles from a Novel Methoxypolyethylene Glycol Cyanoaycrylate-Hexadecyl Cyanoacrylate Amphiphilic Copolymer.* Pharmaceutical Research, 1998. **15**(4).
30. Lemarchand, C., et al., *Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems.* Biomaterials., 2006. **27**(1): p. 108-18.
31. Vonarbourg, A., et al., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems.* Biomaterials, 2006. **27**: p. 4356-4373.
32. Ranney, D.F., *Biomimetic Transport and Rational Drug delivery.* Biochemical Pharmacology, 2000. **59**: p. 105-114.
33. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. 631-651.
34. Brigger, I., et al., *Poly(ethylene glycol)-Coated hexadecylcyanoacrylate Nanospheres Display a Combined Effect for Brain Tumor Targeting.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **303**(3): p. 928-936.
35. Charreyre, M.T., et al., *Surface Functionalization of Polystyrene Nanoparticles with Liposaccharide Monomers: Preparation, Characterization and Applications.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 1999. **14**: p. 64-90.
36. Stella, B., et al., *Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **89**(11): p. 1452-1464.
37. Dinauer, N., et al., *Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes.* Biomaterials, 2005. **26**: p. 5898-5906.
38. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface.* Nat Biotechnol, 2000. **18**(8): p. 893-

5.
39. Cohen, H., et al., *Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles.* Gene Ther, 2000. **7**(22): p. 1896-905.
40. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.* Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(3): p. 329-47.
41. Bisht, S., et al., *pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery.* Int J Pharm., 2005. **288**(1): p. 157-68. Epub 2004 Nov 21.
42. Gopalan, B., et al., *Nanoparticle based systemic gene therapy for lung cancer: molecular mechanisms and strategies to suppress nanoparticle-mediated inflammatory response.* Technol Cancer Res Treat., 2004. **3**(6): p. 647-57.
43. Luo, D., et al., *A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles.* J Control Release., 2004. **95**(2): p. 333-41.
44. Sameti, M., et al., *Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery.* Int J Pharm, 2003. **266**(1-2): p. 51-60.
45. Ravi Kumar, M.N., et al., *Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery.* J Nanosci Nanotechnol, 2004. **4**(7): p. 876-81.
46. Elamanchili, P., et al., *Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells.* Vaccine, 2004. **22**(19): p. 2406-12.
47. van der Lubben, I.M., et al., *Chitosan for mucosal vaccination.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **52**(2): p. 139-44.
48. Russell-Jones, G.J., *Oral vaccine delivery.* J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 49-54.
49. Brayden, D.J. and A.W. Baird, *Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation.* Microbes Infect, 2001. **3**(10): p. 867-76.
50. Mirshahi, T., et al., *Adaptive immune responses of legumin nanoparticles.* J Drug Target., 2002. **10**(8): p. 625-31.
51. Cui, Z. and R.J. Mumper, *Genetic immunization using nanoparticles engineered from microemulsion precursors.* Pharm Res., 2002. **19**(7): p. 939-46.
52. Cui, Z. and R.J. Mumper, *The effect of co-administration of adjuvants with a nanoparticle-based genetic vaccine delivery system on the resulting immune responses.* Eur J Pharm Biopharm., 2003. **55**(1): p. 11-8.
53. Kreuter, J., *Nanoparticle-based drug delivery system.* Journal of Controlled Release, 1991. **16**: p. 169-176.
54. Meissner, Y., et al., *Low molecular weight heparin loaded pH-sensitive microparticles.* Int J Pharm, 2006. **10**: p. 10.
55. Trapani, A., et al., *Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies.* Eur J Pharm Sci, 2006. **25**: p. 25.
56. Fulzele, S.V., P.M. Satturwar, and A.K. Dorle, *Novel biopolymers as implant matrix for the delivery of ciprofloxacin: Biocompatibility, degradation, and in vitro antibiotic release.* J Pharm Sci., 2007. **96**(1): p. 132-44.
57. Spector, R., *Drug transport in the mammalian central nervous system: multiple complex systems. A critical analysis and commentary.* Pharmacology., 2000. **60**(2): p. 58-73.
58. Jahnke, K., et al., *Implications of the blood-brain barrier in primary central*

nervous system lymphoma. Neurosurg Focus., 2006. **21**(5): p. E11.
59. Doolittle, N.D., et al., *New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood-brain barrier: report of the tenth annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting.* Clin Cancer Res., 2005. **11**(2 Pt 1): p. 421-8.
60. Agus, D.B., et al., *Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters.* J Clin Invest., 1997. **100**(11): p. 2842-8.
61. Jong, A. and S.H. Huang, *Blood-brain barrier drug discovery for central nervous system infections.* Curr Drug Targets Infect Disord., 2005. **5**(1): p. 65-72.
62. Pardridge, W.M., *Drug delivery to the brain.* J Cereb Blood Flow Metab., 1997. **17**(7): p. 713-31.
63. Girardin, F., *Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development.* Dialogues Clin Neurosci., 2006. **8**(3): p. 311-21.
64. Takada, Y., et al., *Rapid high-affinity transport of a chemotherapeutic amino acid across the blood-brain barrier.* Cancer Res., 1992. **52**(8): p. 2191-6.
65. Borchard, G. and J. Kreuter, *Interaction of serum components with poly(methylmethacrylate) nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection in rats.* J Drug Target., 1993. **1**(1): p. 15-9.
66. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting.* J Drug Target., 1995. **3**(3): p. 171-3.
67. Schroder, U. and B.A. Sabel, *Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgesic effects of i.v. dalargin injections.* Brain Res., 1996. **710**(1-2): p. 121-4.
68. Alyautdin, R.N., et al., *Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles.* Pharm Res., 1997. **14**(3): p. 325-8.
69. Ramge, P., et al., *Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells.* Eur J Neurosci., 2000. **12**(6): p. 1931-40.
70. Schroeder, U., et al., *Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier.* J Pharm Sci., 1998. **87**(11): p. 1305-7.
71. Steiniger, S.C., et al., *Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles.* Int J Cancer., 2004. **109**(5): p. 759-67.
72. Roney, C., et al., *Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease.* J Control Release., 2005. **108**(2-3): p. 193-214. Epub 2005 Oct 24.
73. Bharali, D.J., et al., *Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2005. **102**(32): p. 11539-44. Epub 2005 Jul 28.
74. Egea, M.A., et al., *Entrapment of cisplatin into biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles.* Farmaco., 1994. **49**(3): p. 211-7.
75. Jing, M., et al., *[Labeling neural stem cells with superparamagnetic iron oxide in vitro and tracking after implantation with MRI in vivo].* Zhonghua Yi Xue Za Zhi., 2004. **84**(16): p. 1386-9.
76. Miyoshi, S., et al., *Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization.* Mol Imaging Biol., 2005. **7**(4): p. 286-95.
77. Lepore, A.C., et al., *MR imaging of lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult spinal cord.* Exp Neurol., 2006. **201**(1):

p. 49-59. Epub 2006 Jun 9.
78. Watson, D.J., et al., *Structure-specific patterns of neural stem cell engraftment after transplantation in the adult mouse brain.* Hum Gene Ther., 2006. **17**(7): p. 693-704.
79. Cengelli, F., et al., *Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures.* J Pharmacol Exp Ther., 2006. **318**(1): p. 108-16. Epub 2006 Apr 11.
80. Cui, Z., et al., *Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases.* Eur J Pharm Biopharm., 2005. **59**(2): p. 263-72.
81. Liu, X.H., et al., *[Structural study on the transparency of cross-linked polyester polyurethane].* Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi., 2006. **26**(1): p. 40-4.
82. Wadghiri, Y.Z., et al., *Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging.* Magn Reson Med., 2003. **50**(2): p. 293-302.
83. Calvo, P., et al., *PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases.* J Neurosci Methods., 2001. **111**(2): p. 151-5.
84. Zheng, G., et al., *Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpa 2MR, and the receptor-associated protein (RAP).* J Histochem Cytochem., 1994. **42**(4): p. 531-42.
85. Tooyama, I., et al., *Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain.* Brain Res., 1995. **691**(1-2): p. 235-8.
86. Zlokovic, B.V., et al., *Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**(9): p. 4229-34.
87. Dehouck, B., et al., *A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier.* J Cell Biol., 1997. **138**(4): p. 877-89.
88. Lucarelli, M., et al., *The expression of native and oxidized LDL receptors in brain microvessels is specifically enhanced by astrocytes-derived soluble factor(s).* FEBS Lett., 2002. **522**(1-3): p. 19-23.
89. Luck, M., et al., *Identification of plasma proteins facilitated by enrichment on particulate surfaces: analysis by two-dimensional electrophoresis and N-terminal microsequencing.* Electrophoresis., 1997. **18**(15): p. 2961-7.
90. Alyautdin, R.N., et al., *Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study.* J Microencapsul., 1998. **15**(1): p. 67-74.
91. Huwyler, J., D. Wu, and W.M. Pardridge, *Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**(24): p. 14164-9.
92. Mayer, L.D., *Future developments in the selectivity of anticancer agents: drug delivery and molecular target strategies.* Cancer Metastasis Rev., 1998. **17**(2): p. 211-8.
93. Chu, Z., et al., *Saposin C: neuronal effect and CNS delivery by liposomes.* Ann N Y Acad Sci., 2005. **1053**: p. 237-46.
94. Bulte, J.W., et al., *Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells.* Nat Biotechnol., 2001. **19**(12): p. 1141-7.
95. Suto, M.J. and N. Zacharias, *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as drug targets.* Expert Opin Ther Targets., 2004. **8**(2): p. 61-4.

96. Blank, T., et al., *Small conductance Ca2+-activated K+ channels as targets of CNS drug development.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord., 2004. **3**(3): p. 161-7.
97. Xiang, S., W. Pan, and A.J. Kastin, *Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord.* Curr Pharm Des., 2005. **11**(10): p. 1267-77.
98. Lundstrom, K., *Biology and application of alphaviruses in gene therapy.* Gene Ther., 2005. **12**(Suppl 1): p. S92-7.
99. Rousselle, C., et al., *Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity.* J Pharmacol Exp Ther., 2001. **296**(1): p. 124-31.
100. Miana-Mena, F.J., et al., *A non-viral vector for targeting gene therapy to motoneurons in the CNS.* Neurodegener Dis., 2004. **1**(2-3): p. 101-8.
101. Fears, C.Y., et al., *Could labeled neuronal progenitor cells be used to target glioma tumor endothelium?* Cancer Biol Ther., 2004. **3**(9): p. 845-6. Epub 2004 Sep 26.
102. Tatard, V.M., et al., *Combining polymeric devices and stem cells for the treatment of neurological disorders: a promising therapeutic approach.* Curr Drug Targets., 2005. **6**(1): p. 81-96.
103. Katsuragi, S., et al., *Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats.* Am J Obstet Gynecol., 2005. **192**(4): p. 1137-45.
104. Li, W., et al., *Selecting the optimum silicone particle size/cationic polymer structure to maximize shampoo conditioning performance.* J Cosmet Sci., 2006. **57**(2): p. 178-80.
105. El-Malah, Y., S. Nazzal, and C.B. Bottom, *Hard Gelatin and Hypromellose (HPMC) Capsules: Estimation of Rupture Time by Real-time Dissolution Spectroscopy.* Drug Dev Ind Pharm., 2007. **33**(1): p. 27-34.
106. Constantin, M., et al., *Preparation and characterisation of poly(vinyl alcohol)/cyclodextrin microspheres as matrix for inclusion and separation of drugs.* Int J Pharm., 2004. **285**(1-2): p. 87-96.
107. Kost, J. and S. Shefer, *Chemically-modified polysaccharides for enzymatically-controlled oral drug delivery.* Biomaterials., 1990. **11**(9): p. 695-8.
108. Zolle, I., B.A. Rhodes, and H.N. Wagner, Jr., *Preparation of metabolizable radioactive human serum albumin microspheres for studies of the circulation.* Int J Appl Radiat Isot., 1970. **21**(3): p. 155-67.
109. Coradin, T., S. Bah, and J. Livage, *Gelatine/silicate interactions: from nanoparticles to composite gels.* Colloids Surf B Biointerfaces., 2004. **35**(1): p. 53-8.
110. Vandervoort, J. and A. Ludwig, *Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use.* Eur J Pharm Biopharm., 2004. **57**(2): p. 251-61.
111. Bajpai, A.K. and J. Choubey, *Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate.* J Mater Sci Mater Med., 2006. **17**(4): p. 345-58.
112. Klein, L., *Sol Gel Formation and Deposition.* Handbook of Nanophase Materials, 1997: p. 43-62.
113. Roth, M. and R. Hempelmann, *Nanocrystalline LiF via Microemulsion Systems.* J. Mater. Chem., 1999. **9**: p. 493-497.

114. Tieke, B., *Makromolekulare Chemie*. 1997: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
115. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties.* J Pharm Pharmacol., 1979. **31**(5): p. 331-2.
116. Rollot, J.M., et al., *Physicochemical and morphological characterization of polyisobutyl cyanoacrylate nanocapsules.* J Pharm Sci., 1986. **75**(4): p. 361-4.
117. Balghat, M. and J.S.P. Rosaria P. Haugland, Sharon Swan, Richard P. Haugland, *Green- and red-fluorescent nanospheres for the detection of cell surface receptors by flow cytometry.* Journal of Immunological Methods, 1998. **219**: p. 57-68.
118. Dubertret, B. and A.J.L. Michel Calame, *Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides.* Nature Biotechnology, 2001. **19**: p. 365-370.
119. Taylor, J. and S.N. Michelle M. Fang, *Probing Specific Sequences on Single DNA Molecules with Bioconjugated Fluorescent Nanoparticles.* Analytical Chemistry, 2000. **72**: p. 1979-1986.
120. Charreyre, M. and M.A.W. Ping Zhang, Christian Pichot, Christian Graillat, *Adsorption of Rhodamine 6G onto Polystyrene Latex Particles with Sulfate Groups at the Surface.* Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **170**(2): p. 374-382.
121. Tronc, F. and J.L. Mei Li, Mitchell A. Winnik, Bansi Lal Kaul, Jean-Christophe Graciet, *Fluorescent Polymer Particles by Emulsion and Miniemulsion Polymerization.* Journal of Polymer Science, 2003. **41**: p. 766-778.
122. Gibanel, S. and Y.G. valerie Heroguez, Esteban Aramendia, Alexander Bucsi, Jacqueline Forcada, *Monodispersed Polystyrene Latex Particles Functionalized by the Macromonomer Technique. II. Applcation in Immunodiagnosis.* Polymers for Advanced Technologies, 2001. **12**: p. 494-499.
123. Ortega-Vinuesa, J. and R.H.-À. D. Bastos-Gonzalez, *Comparative Studies on Physically Adsorbed and Chemically Bound IgG to Carboxlated Latexes, II.* Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **176**(1): p. 240-247.
124. Bastos-González, D. and F.J.D.L. J. L. Ortega-Vinuesa, R. Hidalgo-Álvarez, *Carboxylated Latexes for Covalent Coupling Antibodies I.* Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **176**(1): p. 232-239.
125. Landfester, K., Top. Curr. Chem., 2003. **75**.
126. Lacava, L.M., et al., *Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice.* Biophys J., 2001. **80**(5): p. 2483-6.
127. Zhang, J., et al., *Synthesis of poly(ethylene glycol)-metaxalone conjugates and study of its controlled release in vitro.* Int J Pharm, 2006. **29**: p. 29.
128. Zobel, H.P., et al., *Evaluation of aminoalkylmethacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part II: characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles.* Eur J Pharm Biopharm, 1999. **48**(1): p. 1-12.
129. Moghimi, S.M. and A.C. Hunter, *Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine.* Trends Biotechnol., 2000. **18**(10): p. 412-20.
130. Redhead, H.M., S.S. Davis, and L. Illum, *Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation.* J Control Release., 2001. **70**(3): p. 353-63.

131. Csaba, N., et al., *PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery.* Biomacromolecules., 2005. **6**(1): p. 271-8.
132. Araujo, L., R. Lobenberg, and J. Kreuter, *Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles.* J Drug Target., 1999. **6**(5): p. 373-85.
133. Cryan, S.A. and C.M. O'Driscoll, *Mechanistic studies on nonviral gene delivery to the intestine using in vitro differentiated cell culture models and an in vivo rat intestinal loop.* Pharm Res., 2003. **20**(4): p. 569-75.
134. Montet-Abou, K., et al., *Transfection agent induced nanoparticle cell loading.* Mol Imaging., 2005. **4**(3): p. 165-71.
135. Arbab, A.S., et al., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI.* Blood., 2004. **104**(4): p. 1217-23. Epub 2004 Apr 20.
136. Gershon, H., et al., *Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection.* Biochemistry, 1993. **32**(28): p. 7143-51.
137. Shikata, F., et al., *In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer.* Eur J Pharm Biopharm, 2002. **53**(1): p. 57-63.
138. Arbab, A.S., et al., *Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques.* Transplantation., 2003. **76**(7): p. 1123-30.
139. Wilhelm, C., et al., *Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating.* Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 1001-11.
140. Zhao, M., et al., *Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake.* Bioconjug Chem, 2002. **13**(4): p. 840-4.
141. Vives, E., *Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions.* J Mol Recognit, 2003. **16**(5): p. 265-71.
142. Richard, J.P., et al., *Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake.* J Biol Chem., 2003. **278**(1): p. 585-90. Epub 2002 Oct 30.
143. Win, K.Y. and S.S. Feng, *In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation.* Biomaterials., 2006. **27**(10): p. 2285-91. Epub 2005 Nov 28.
144. Sun, R., et al., *Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison.* Invest Radiol., 2005. **40**(8): p. 504-13.
145. Zhang, Y., N. Kohler, and M. Zhang, *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.* Biomaterials., 2002. **23**(7): p. 1553-61.
146. Faria, M.C., et al., *Use of cyanoacrylate in skin closure for ovariohysterectomy in a population control programme.* J Feline Med Surg., 2005. **7**(2): p. 71-5.
147. Eskandari, M.M., et al., *Cyanoacrylate adhesive provides efficient local drug delivery.* Clin Orthop Relat Res., 2006. **451**: p. 242-50.
148. Kreuter, J., et al., *Passage of peptides through the blood-brain barrier with*

colloidal polymer particles (nanoparticles). Brain Res., 1995. **674**(1): p. 171-4.
149. Jendelova, P., et al., *Magnetic resonance tracking of human CD34+ progenitor cells separated by means of immunomagnetic selection and transplanted into injured rat brain.* Cell Transplant., 2005. **14**(4): p. 173-82.
150. Varshney, M., et al., *Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of Escherichia coli O157:H7 in ground beef.* J Food Prot., 2005. **68**(9): p. 1804-11.
151. Lewin, M., et al., *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells.* Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 410-4.
152. Frank, J.A., et al., *Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging* Cytotherapy., 2004. **6**(6): p. 621-5.
153. Delikatny, E.J. and H. Poptani, *MR techniques for in vivo molecular and cellular imaging.* Radiol Clin North Am., 2005. **43**(1): p. 205-20.
154. Yan, S., et al., *Therapeutic effect of Fe2O3 nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers.* J Nanosci Nanotechnol., 2005. **5**(8): p. 1185-92.
155. Hilger, I., et al., *[Magnetic thermotherapy of breast tumors: an experimental therapeutic approach].* Rofo., 2005. **177**(4): p. 507-15.
156. Giri, J., et al., *Investigation on Tc tuned nano particles of magnetic oxides for hyperthermia applications.* Biomed Mater Eng., 2003. **13**(4): p. 387-99.
157. Petersein, J., S. Saini, and R. Weissleder, *Liver. II: Iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging. Clinical review.* Magn Reson Imaging Clin N Am., 1996. **4**(1): p. 53-60.
158. Kraitchman, D.L., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction.* Circulation., 2003. **107**(18): p. 2290-3. Epub 2003 May 5.
159. Frank, J.A., et al., *Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents.* Acad Radiol., 2002. **9**(Suppl 2): p. S484-7.
160. Reese, T.S. and M.J. Karnovsky, *Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.* J Cell Biol., 1967. **34**(1): p. 207-17.
161. Corot, C., et al., *Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging.* Adv Drug Deliv Rev., 2006. **58**(14): p. 1471-504. Epub 2006 Sep 30.
162. Metz, S., et al., *Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro.* Eur Radiol., 2004. **14**(10): p. 1851-8. Epub 2004 Jul 13.
163. Ringhoffer, M., et al., *CD34 cell selection of peripheral blood progenitor cells using the CliniMACS device for allogeneic transplantation: clinical results in 102 patients.* Br J Haematol., 2004. **126**(4): p. 527-35.
164. Harousseau, J.L., *Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1, or 2).* Curr Opin Oncol., 2005. **17**(2): p. 93-8.
165. Appelbaum, F.R. and S.F. Pearce, *Hematopoietic cell transplantation in first complete remission versus early relapse.* Best Pract Res Clin Haematol., 2006. **19**(2): p. 333-9.
166. Ueno, N.T. and Y.C. Cheng, *The future of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma in the era of target-specific*

therapy. Bone Marrow Transplant., 2006. **38**(11): p. 711-4.
167. Weissman, I.L., *Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities.* Science., 2000. **287**(5457): p. 1442-6.
168. Arai, T., et al., *Dual in vivo magnetic resonance evaluation of magnetically labeled mouse embryonic stem cells and cardiac function at 1.5 t.* Magn Reson Med., 2006. **55**(1): p. 203-9.
169. Aicher, A., et al., *Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling.* Circulation., 2003. **107**(16): p. 2134-9. Epub 2003 Apr 14.
170. Chen, S.L., et al., *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.* Am J Cardiol., 2004. **94**(1): p. 92-5.
171. Brenner, W., et al., *111In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model.* J Nucl Med., 2004. **45**(3): p. 512-8.
172. Kang, H.J., et al., *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.* Lancet., 2004. **363**(9411): p. 751-6.
173. Kustermann, E., et al., *Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation.* NMR Biomed., 2005. **18**(6): p. 362-70.
174. Hofmann, M., et al., *Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium.* Circulation., 2005. **111**(17): p. 2198-202. Epub 2005 Apr 25.
175. Ince, H., et al., *Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI).* Circulation., 2005. **112**(20): p. 3097-106. Epub 2005 Nov 7.
176. Janssens, S., et al., *Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial.* Lancet., 2006. **367**(9505): p. 113-21.
177. Arbab, A.S., et al., *A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging.* NMR Biomed., 2005. **18**(6): p. 383-9.
178. Ju, S., et al., *In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood.* Magn Reson Imaging., 2006. **24**(5): p. 611-7. Epub 2006 Feb 17.
179. Arbab, A.S., et al., *Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging.* Radiology, 2003. **229**(3): p. 838-46.
180. Wagner, E., *Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery.* Adv Drug Deliv Rev., 1999. **38**(3): p. 279-289.
181. Wu, J., et al., *Liposome-mediated extracellular superoxide dismutase gene delivery protects against acute liver injury in mice.* Hepatology., 2004. **40**(1): p. 195-204.
182. Hu, Y., Y. Jin, and Y. Xia, *The characterization of cationic fusogenic liposomes mediated antisense oligonucleotides into HeLa cells.* Drug Dev Ind Pharm., 2004. **30**(2): p. 135-41.
183. Caruthers, S.D., et al., *Targeted magnetic resonance imaging contrast agents.*

Methods Mol Med., 2006. **124**: p. 387-400.
184. Hardy, J., et al., *Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo.* Exp Hematol., 2001. **29**(12): p. 1353-60.
185. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors.* J Immunol., 2003. **170**(8): p. 4069-76.
186. www.egbeck.de.
187. Niedergang, F. and P. Chavrier, *Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome.* Curr Opin Cell Biol., 2004. **16**(4): p. 422-8.
188. Harizi, H. and N. Gualde, *The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells.* Tissue Antigens., 2005. **65**(6): p. 507-14.
189. Fabriek, B.O., C.D. Dijkstra, and T.K. van den Berg, *The macrophage scavenger receptor CD163.* Immunobiology., 2005. **210**(2-4): p. 153-60.
190. Pepe, M., et al., *Toll-like receptor-positive cells and recognition of pathogens: how human myeloid dendritic cells respond to in vitro infection with Leishmania infantum.* Curr Pharm Des., 2006. **12**(32): p. 4255-62.
191. Liu, J. and J.I. Shapiro, *Endocytosis and signal transduction: basic science update.* Biol Res Nurs., 2003. **5**(2): p. 117-28.
192. Anderson, R., *Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins.* Curr. Opin. Cell Biol. , 1993. **5**: p. 647-652
193. Fischer, R., et al., *A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(2): p. 365-74.
194. Jensen, K.D., et al., *Cytoplasmic delivery and nuclear targeting of synthetic macromolecules.* J Control Release, 2003. **87**(1-3): p. 89-105.
195. Schulze, E., et al., *Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro.* Invest Radiol, 1995. **30**(10): p. 604-10.
196. Pratten, M.K. and J.B. Lloyd, *Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro.* Biochim Biophys Acta, 1986. **881**(3): p. 307-13.
197. Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, D.
198. Walmsley, T.A., P.M. George, and R.T. Fowler, *Colorimetric measurement of iron in plasma samples anticoagulated with EDTA.* J Clin Pathol., 1992. **45**(2): p. 151-4.
199. Suwansaksri, J., et al., *Comparative study on serum iron determination by different methods.* Lab Hematol., 2003. **9**(4): p. 234-6.
200. Riemer, J., et al., *Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells.* Anal Biochem., 2004. **331**(2): p. 370-5.
201. Internet, *http://www.jenskleemann.de/wissen/bildung/thumb/d/d9/prinzip_konfokalmikroskop.png*.
202. Internet, Uwe Falke.
203. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Circ Res, 1999. **284**: p. 134-7.
204. Walther, P. and A. Ziegler, *Freeze Substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water.* Journal of Microscopy, 2002. **208**: p. 3-10.

205. Philpott, N.J., et al., *The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques.* Blood., 1996. **87**(6): p. 2244-51.
206. Noel, D., F. Djouad, and C. Jorgense, *Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair.* Curr Opin Investig Drugs., 2002. **3**(7): p. 1000-4.
207. Zimmet, J. and J. Hare, *Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy.* Basic Res Cardiol., 2005. **100**(6): p. 471-81.
208. Kemp, K., J. Hows, and C. Donaldson, *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Leuk Lymphoma., 2005. **46**(11): p. 1531-44.
209. Patil, S.D., D.G. Rhodes, and D.J. Burgess, *Anionic liposomal delivery system for DNA transfection.* Aaps J, 2004. **6**(4): p. e29.
210. Arbab, A.S., et al., *Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability.* Mol Imaging., 2004. **3**(1): p. 24-32.
211. Leuschner, C., et al., *LHRH-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for detection of breast cancer metastases.* Breast Cancer Res Treat., 2006. **99**(2): p. 163-76. Epub 2006 Jun 3.
212. Warren, R.A., F.A. Green, and C.A. Enns, *Saturation of the endocytic pathway for the transferrin receptor does not affect the endocytosis of the epidermal growth factor receptor.* J Biol Chem., 1997. **272**(4): p. 2116-21.
213. Eisenstein, M., *Cell sorting: divide and conquer.* Nature., 2006. **441**(7097): p. 1179-85.
214. Arnold, L.J., Jr., et al., *Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1979. **76**(7): p. 3246-50.
215. Holzapfel, V., Dissertation, *Funktionalisierte fluoreszierende und magnetische Polymernanopartikel für biomedizinische Anwendungen*. 2006.
216. Holzapfel, V., et al., *Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionallized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells.* Macromol Chem Phys, 2005. **205**: p. 2440-9.
217. Wilhelm, C., F. Gazeau, and J.C. Bacri, *Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells.* Eur Biophys J, 2002. **31**(2): p. 118-25. Epub 2002 Feb 9.
218. Billotey, C., et al., *Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging.* Magn Reson Med, 2003. **49**(4): p. 646-54.
219. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell.* Nature., 2003. **422**(6927): p. 37-44.
220. Besterman, J.M. and R.B. Low, *Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics.* Biochem J., 1983. **210**(1): p. 1-13.
221. Ziegler, A., Fau - Nervi, Pierluigi, et al., *The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence.* Biochemistry, 2005. **44**(1): p. 138-48.
222. Arnedo, A., et al., *Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide.* J Control Release, 2004. **94**(1): p. 217-27.
223. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis.* Biochem J., 2004. **377**(Pt 1):

p. 159-69.
224. Holzapfel, V., et al., *Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process.* J. Phys.: Condens. Matter, 2006. **18**: p. 2581-2594.
225. Moor, H., *Use of freeze-etching in the study of biological ultrastructure.* Int Rev Exp Pathol., 1966. **5**: p. 179-216.
226. Hohenberg, H., M. Tobler, and M. Muller, *High-pressure freezing of tissue obtained by fine-needle biopsy.* J Microsc., 1996. **183**(Pt 2): p. 133-9.
227. Dass, M., *Intrazelluläre Aufnahme von suspendierten Nanopartikeln*. 2006.
228. Lherm, C., et al., *Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length.* International Journal of Pharmaceutics, 1992. **84**: p. 13-22.
229. Kante, B., et al., *Toxicity of Polycanoacrylate Nanoparticles I: Free Nanoparticles.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1982. **71**(7): p. 786-790.
230. Hinrichsen, L., et al., *Bending a membrane: how clathrin affects budding.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**(23): p. 8715-20. Epub 2006 May 30.
231. Lorenz, M.R., et al., *Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells.* Biomaterials., 2006. **27**(14): p. 2820-8. Epub 2006 Jan 23.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Katharina Landfester für das interessante Thema und die Möglichkeit, in ihrer Abteilung zu promovieren, bedanken. Außerdem bin ich sehr dankbar für die kompetenten Ratschläge und die Förderung meiner persönlichen Fähigkeiten.

Dr. Volker Mailänder bin ich dankbar für seine Hilfe, Anleitung und Diskussionsbereitschaft bei meiner Arbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Meiner Freundin Karin Fuchs danke für ihre praktische Unterstützung und ihr sehr großes Engagement. Danke für die Aufmunterung und die schöne Zeit, die wir zusammen hatten.

Allen Kollegen am Institut für Transfusionsmedizin und Immunogenetik möchte ich ebenfalls für die Unterstützung der Arbeit und die freundschaftliche Atmosphäre danken.

Allen Mitarbeitern der organischen Chemie III danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann Steffen, dass sie immer beratend und unterstützend an meiner Seite standen und so das Erreichen all meiner Ziele ermöglicht haben. Insbesondere danke ich Steffen für seine unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft.

LEBENSLAUF



Persönliche Daten:	Myriam Ricarda Lorenz Geb. Kern Meisenweg 21 89160 Dornstadt/Bollingen Deutschland geb. am 09.01.1979 in Kirchheim unter Teck verheiratet
Schule:	
9/1984-8/1988	Grundschule Bünzwangen
9/1988-8/1989	Raichberg-Gymnasium Ebersbach/Fils
9/1989-6/1998	Albert-Schweizer-Gymnasium Laichingen
Hochschule:	
10/1998-1/2004	Studium Diplom-Biologie an der Universität Ulm
10/2001	Vordiplom Gesamtnote 2,0
12/2003	Diplom Gesamtnote 1,7
	Thema der Diplomarbeit : Cloning, expression and experiments for purification of ecdysteroid-receptor and Ultraspiracle
3/2004-5/2007	Promotion zum Dr. rer. nat. in der Transfusionsmedizin/ Organische Chemie 3 an der Universität Ulm Thema der Dissertation: Markierung immortalisierter Zelllinien und Stammzellen mit funktionalisierten Partikeln für biomedizinische Anwendungen
Sprachen:	Englisch fließend Norwegisch Grundkenntnisse

Publikationen

Poster

EUPOC Konferenz
30/05/2004-04/06/2004, Gargano, Italien

Kolloquium des DFG Schwerpunktprogramms „Colloidal magnetic fluids“ (SPP1104)
27/09/2004-29/09/2004, Benediktbeuern, Deutschland

Kolloquium des DFG Schwerpunktprogramms „Colloidal magnetic fluids“ (SPP1104)
26/09/2005-28/09/2005, Benediktbeuern, Deutschland

Kolloquium des DFG Schwerpunktprogramms „Colloidal magnetic fluids“ (SPP1104)
27/09/2006-29/09/2006, Benediktbeuern, Deutschland

Innano 2006
19-20/10/2006 Innsbruck, Österreich

Vorträge

Mitarbeitertreffen des DFG Schwerpunktprogramms „Colloidal magnetic fluids“ (SPP1104)
25/11/2004-26/11/2004, Jena, Deutschland

Mitarbeitertreffen des DFG Schwerpunktprogramms „Colloidal magnetic fluids“ (SPP1104)
01/12/2005-02/12/2005, Erlangen, Deutschland

Veröffentlichungen

Holzapfel V., Lorenz MR., Musyanovych A., and Landfester K., *Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionallized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells.* Macromol. Chem. Phys., 2005. **205**: p. 2440-9.

Lorenz MR., Holzapfel V., Musyanovych A., Nothelfer K., Walther, P., Frank H., Landfester K., Schrezenmeier H., and Mailänder V., *Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells.* Biomaterials., 2006. **27**(14): p. 2820-8.

Holzapfel V., Lorenz MR., Weiss CK., Schrezenmeier H., Landfester K., Mailänder V., *Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process.* J. Phys.: Condens. Matter, 2006. **18**: p. 2581-2594.

Weiss CK., Lorenz MR., Landfester K., Mailänder V., *Cellular uptake behavior of unfunctionalized and functionalized PBCA particles prepared in miniemulsion.* Macromol. Biosci., 2007.

Mailänder V., Lorenz MR., Holzapfel V., Musyanovych A., Fuchs K., Wiesneth M., Walther P., Landfester K., Schrezenmeier H., *Carboxylated superparamagnetic Iron Oxide Particles label cells intracellularly without Transfection Agents* (eingereicht).

Drei weitere Publikationen in Vorbereitung:

Lorenz MR., Kohnle MV., Dass M., Walther P., Höcherl A., Ziener U., Landfester K., Mailänder V., *Uptake of polyisoprene nanoparticles into various cells.*

Holzapfel V., Lorenz MR., Landfester K., Mailänder V., *Fluorescent polystyrene particles with aminoacid functionalized surfaces.*

Musyanovych A., Lorenz MR., Weiss CK., Kohnle MV., Landfester K., Mailänder V., *Nanoparticles for biomedical applications.*

Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von März 2004 bis April 2007 in der Abteilung Organische Chemie III der Universität Ulm erstellt.

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

Ulm, den 23.04.07 Myriam Lorenz

Myriam Lorenz