

Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin II  
Kardiologie, Angiologie, Pneumologie,  
Sport- und Rehabilitationsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

Generierung eines molekularen Kontrastmittels auf der Grundlage von  
antikörpergekoppelten Nanopartikeln  
zur spezifischen Antigendetektion  
-Proof of the principle-

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der  
Medizinischen Fakultät der  
Universität Ulm

Vorgelegt von  
Nina Winter  
aus Aachen  
2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Torzewski
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Greiner

Tag der Promotion: 25. Juni 2010

**Meinen Eltern gewidmet.**

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>II</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE.....	2
1.2 POLYMERE ALS NANOPARTIKEL IN DER MEDIZIN .....	4
1.3 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....	10
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
2.1 MATERIAL UND GERÄTE .....	11
2.2 METHODEN .....	15
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
3.1 VERWENDETE POSITIVKONTROLLEN.....	30
3.2 I: EIGENFLUORESZENZ DER POLYSTYROLNANOPARTIKEL .....	31
3.3 II: KOPPLUNG DER POLYSTYROLNANOPARTIKEL MIT VERSCHIEDENEN STOFFE ZUR REDUKTION UNSPEZIFISCHER BINDUNGEN.....	32
3.4 III: BINDUNGSEIGENSCHAFTEN AK-GEKOPPELTER NANOPARTIKEL.....	37
3.5 IV: BILDLICHER NACHWEIS DER NANOPARTIKEL-ANTIGEN-KOPPLUNG AUF DEN ZIELZELLEN .....	47
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
4.1 NANOPARTIKEL ALS SPEZIFISCHE TRÄGERELEMENTE IN DER MEDIZIN.....	51
4.2 NANOPARTIKEL ALS SPEZIFISCHE ZELLMARKER IN DER MEDIZIN.....	54
4.3 AUSBLICK .....	59
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>61</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>62</b>
<b>7 DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>76</b>
<b>8 LEBENS LAUF .....</b>	<b>78</b>

---

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:**

$\alpha$ - MEM	$\alpha$ - minimum essential medium
AK	Antikörper
AEMH	2-Aminoethyl-Methacrylat- Hydrochlorid
AML	Akute Myeloische Leukämie
C°	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ED50	Maß für die Wirksamkeitsgrenze; Dosis bei der 50% der Versuchsobjekte die erwartete Wirkung zeigen
EF	Ejektionsfraktion
EPON	Kunstharz
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FCS	Fetal bovine serum
FSC	Forward scatter
Gl.Ald.	Glutaraldehyd
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
Lut	Lutensol (AT50)
NSL	N=amino,S=styrol,L=lutensol
NYHA	New York Heart Association
min	Minute
MLI	Mittlere Leuchtintensität
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MW	Mittelwert
P	Probe
PBS	Phosphate buffered saline
PCD	Particle charge detektor
PEG	Polyethylenglykol
PLL	Poly-L-Lysin
PMI	Perylen monoimid
PSC	Penicillin, Streptomycin, Glutamine
REM	Rasterelektronenmikroskop

---

RH414	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(4-(diethylamino)phenyl)butadienyl)-pyridinium dibromide
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	S=Styrol, L=Lutensol
SLPEG	Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol
SPEG	Styrol-Polyethylenglykol
SPSC	Styrol-PEG Succinimidyl Carbonat
SSC	Sideward scatter
TCR	T-cell receptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THF	Tetrahydrofuran
V-59	Hydrophober Initiator 2,2'-Azobis (2-methylbutyronitrile)

---

## 1 Einleitung

In der heutigen Zeit basiert die Diagnostik zahlreicher Erkrankungen verschiedener Organsysteme wie beispielweise Leber, Lymphknoten oder Nieren auf der Durchführung von invasiven Untersuchungsmethoden wie Biopsien und Punktionen. Ein Beispiel aus der Kardiologie bildet das Krankheitsbild der Dilatativen Kardiomyopathie (Zimmermann et al. 2006, Schultheiss und Kühl 2009). In den westlichen Industriestaaten zählt die Herzinsuffizienz zu den größten Gesundheitsproblemen unserer Zeit. Während die ischämische Kardiomyopathie die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz darstellt, liegt bei jüngeren Patienten häufig eine idiopathische Dilatative Kardiomyopathie (DCM) vor. Schätzungen zur Folge liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den europäischen Ländern zwischen 0,4% und 2% und nimmt mit ansteigendem Alter stetig zu (Remme et al. 2001). Die Prognose ist immer noch schlecht, da innerhalb der ersten vier Jahre die Hälfte aller erkrankten Patienten versterben (Remme et al. 2001). Wegen der verursachten hohen Gesundheitskosten, stellt die Herzinsuffizienz auch eine große ökonomische Belastung dar. So werden in den USA jährlich über 5% des gesamten Gesundheitsetats für die Behandlung von Herzkrankheiten aufgewendet (Hunt et al. 2002).

Bezogen auf die Dilatative Kardiomyopathie, welche durch eine inflammatorische Autoimmunreaktion im Herzmuskelgewebe oder auch durch eine „chronische“ Myokarditis mit viraler Erregerpersistenz bedingt sein kann, ist eine frühe Diagnosestellung anzustreben. Zur definitiven Diagnosestellung ist nach wie vor die invasive Herzkatheteruntersuchung die Methode der Wahl (Sigusch et al. 1998). Auf diese Weise kann eine Darstellung der Koronararterien, eine Quantifizierung der Ejektionsfraktion (EF) und eine Entnahme von Biopsien aus dem Herzmuskel durchgeführt werden. Die entnommenen Biopsien werden histologisch bzw. immunhistologisch auf das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten oder mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf die Anwesenheit von viralem Genom untersucht. Bis heute kann eine nicht-invasive magnetische Resonanztomographie- (MRT-) Untersuchung zur Diagnosestellung der DCM eine Myokardbiopsie nicht ersetzen (Zimmermann et al. 2006). Da es sich bei diesem Verfahren jedoch um eine invasive Maßnahme handelt, können sowohl leichte als auch schwerwiegende Komplikationen wie zum Beispiel Ventrikelperforationen, Atrioventrikulären- (AV-) Blockierungen oder Ventrikuläre Tachykardien auftreten

---

(Heintzen et al.1997, Schultheiss und Kühl 2009). Demzufolge birgt eine invasive Herzkatheteruntersuchung Risiken für die betroffenen Patienten, beispielsweise postinterventionelle Infektionen oder Blutungen. Um diese Risiken zu minimieren und das diagnostische Procedere zu relativieren, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung eines molekularen Kontrastmittels auf der Basis fluoreszierender, aminofunktionalisierter und antikörpergekoppelter Polystyrolnanopartikel zur spezifischen Antigendetektion. Nachdem das „Proof of the principle“ etabliert ist, soll eine Anwendung bezogen auf das klinische Krankheitsbild der DCM durch Detektion von entzündlichem Infiltrat im Herzmuskel erfolgen.

## **1.1 Dilatative Kardiomyopathie**

Die DCM ist laut WHO-Klassifikation aus dem Jahr 1995 charakterisiert als eine Erkrankung des Herzmuskels, die mit einer systolischen Pumpstörung des dilatierten linken Ventrikels einhergeht.

### **1.1.1 Epidemiologie der DCM**

Die DCM ist mit einem Anteil von bis zu 30% eine der Hauptformen der Kardiomyopathien, die zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führt (Cowie et al. 1997). Im Bezug auf die Altersverteilung tritt die DCM vor allem bei Menschen im jungen und mittleren Lebensalter auf, wobei Mortalität und Morbidität mit zunehmendem Alter steigen (Coughlin SS et al. 1996). Im Hinblick auf die geschlechtliche Verteilung erkranken Männer 2,5-mal häufiger als Frauen (Gillum 1986).

### **1.1.2 Ätiologie/Pathogenese der DCM**

Die eigentlichen Ursachen bzw. Mechanismen der Entstehung der DCM sind bis heute noch weitgehend ungeklärt. Am häufigsten kommt die idiopathische DCM vor. Nachdem Studien gezeigt haben, dass es eine familiäre gehäuft auftretende Form der DCM gibt, wird auch eine genetisch determinierte Form beschrieben (Vincenzo Fragola et al. 1988, Keeling et al. 1995). Zudem existiert eine inflammatorisch bedingte Form der DCM (Dec et al.1985, Towbin 2006, MacArthur et al.1984). So kommt es auf dem Boden einer Auto-Immunreaktion ohne Erregerpersistenz oder einer „chronischen Myokarditis“ ausgelöst durch



---

Enzephalo-Myokarditis-Viren oder Coxsackie-Viren mit Erreger- und Viruspersistenz zu einem entzündlichen Geschehen im Herzmuskelgewebe mit einer entzündlichen Infiltration und anschließenden Nekrosebildung. Histologisch finden sich in Präparaten kardiomyopathischer Herzen deutlich hypertrophierte, normal große bis hin zu stark verschmälerte Myozyten (Ferrans 1989, Roberts et al. 1987, Roberts, 1978). Zusätzlich zeigt sich histologisch eine Volumenvermehrung der Herzmuskelzellen bei einem insgesamt erhöhten Fibroseanteil, der auf einen vorausgegangenen Ausfall von Myozyten hinweist. So scheinen die reaktive Größenzunahme der Herzmuskelzellen sowie eine Neuformierung der Herzmuskelzellen die entscheidenden Faktoren des Ventrikel-Remodellings bei DCM zu sein (Beltrami et al. 1995). Als mögliche Ursachen einer DCM werden die Persistenz kardiotoxischer Viren und autoimmunologischer Prozesse diskutiert. So liegt die Vermutung nahe, dass die entstehende Fibrose eine Folge von Entzündungsreaktionen im Herzmuskel ist (Satoh et al. 2005). Die funktionelle Folge für die an DCM erkrankten Patienten ist eine Gefügedilatation des Herzens, die mit einer linksventrikulären Funktionsstörung einhergeht (Pauschinger et al. 1999, Noutsias et al. 1999, Kühl et al. 1996, Thomas et al. 1998).

### **1.1.3 Diagnostik und Therapie der DCM**

Die Diagnostik der DCM umfasst konventionelle nicht-invasive Methoden, wie die Erhebung einer Anamnese, die körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen, das Aufzeichnen eines Elektrokardiogramms, die Anfertigung von Röntgen-Thorax-Aufnahmen und die Echokardiographie. Die Echokardiographie ist die nicht-invasive Methode der Wahl zur Bestimmung der Größe und Funktion der Herzkammern, Vorhöfe und Herzklappen (Fatkin und Graham 2002). Allerdings kann allein durch nicht-invasive Methoden keine definitive Diagnose gestellt werden (Figulla et al. 1992), so dass bis heute die Herzkatheteruntersuchung als invasive diagnostische Methode durch Quantifizierung der EF, durch Darstellung der Koronararterien und durch die Entnahme von Biopsien aus dem Herzmuskel (Sigusch et al. 1998), welche histologisch bzw. immunhistologisch auf das Vorhandensein von entzündlichen Infiltrat oder mittels PCR auf die Anwesenheit von viralem Genom untersucht werden, zur definitiven Diagnosestellung einer DCM notwendig ist (Zimmermann et al. 2005, Zwaka et al. 2002, Cooper et al. 2007). Die Therapie der symptomatischen DCM richtet sich nach den Leitlinien der

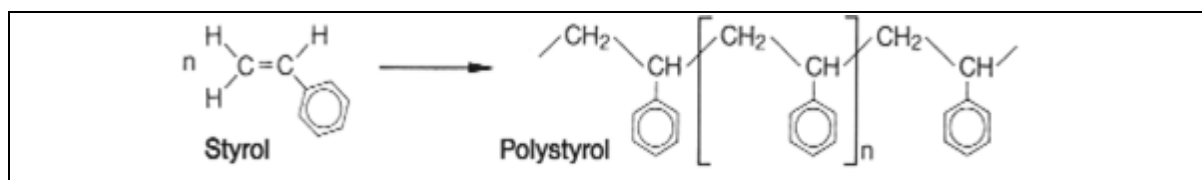
Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (Hoppe 2007). Der Verlauf der DCM ist in der Regel chronisch progredient und kann im fortgeschrittenen Stadium eine Herztransplantation als ultimo ratio bedeuten (Groetzner et al. 2005, Choo et al. 2004).

## 1.2 Polymere als Nanopartikel in der Medizin

### 1.2.1 Polymere

Polymere sind Kettenmoleküle, die durch Verknüpfung von Monomeren (d.h. kleineren Molekülen), aufgebaut werden. Die spezifischen Eigenschaften der Polymere beruhen auf der variablen Polymerkettenlänge und der Art und Abfolge der Monomerbausteine. Aufgrund ihrer molekularen Architektur finden Polymere vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin, bei unterschiedlichen individuellen Eigenschaften (Klein und Borck 2002).

Die Verknüpfung ungesättigter Monomere zu einer gesättigten Polymerkette wird als Polymerisation bezeichnet. Die in dieser Arbeit verwendete Monomerverknüpfung von Styrol wird in Abbildung 1 graphisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Durch Polymerisation wird aus Styrolmonomeren das Polymer. „n“ steht für die variable Anzahl, der durch Polymerisation angefügten Styrolmonomere und die daraus resultierende variable Länge der Styrolpolymerketten (Klein und Borck 2002, S. 92).

Durch dieses Verfahren der Polymerisation entsteht aus Styrolmonomeren das Polymer. Reines Polystyrol (PS) ist hart, farblos und spröde. Gegenüber Säuren, Laugen und Alkohol ist Polystyrol beständig. Es wird jedoch von vielen unipolaren Lösungsmitteln angegriffen. Polystyrol findet in der medizinischen Forschung breite Anwendung und zeichnet sich durch chemische Beständigkeit, geringe Toxizität und leichte Funktionalisierbarkeit aus (Truong-Le et al. 1999, Kreuter 2001, Vijayanathan et al. 2002, Stern und McNeil 2008).

---

## 1.2.2 Nanopartikel in der medizinischen Diagnostik und Therapie

Nanopartikel bestehen aus makromolekularen natürlichen Polymeren, zum Beispiel aus Albumin und Gelatine, oder aus synthetischen Kunststoffen, wie Polystyrol. Ihre Größe variiert in einem Größenbereich von etwa 15 nm bis 1 µm (Speiser 1999).

Nanopartikel gehören, wie Liposomen und Mizellen, zu den kolloidalen Nanoträgersystemen. Wegen ihrer Fähigkeit, die Eigenschaften eines Wirkstoffes oder einer Substanz in die gewünschte Richtung zu verändern, standen sie schon häufig im Mittelpunkt medizinischer Studien. Sie zeichnen sich durch ein breites Spektrum an verwendbaren Materialien und Herstellungstechniken und gute Stabilitätseigenschaften aus. Zudem können ihre Oberflächenbeschaffenheit manuell kontrolliert und variiert werden und ihre Permeabilität im Zielgewebe durch ihre variablen Größenordnungen beeinflusst werden (Stayton et al. 2000). Durch Kopplung eines Arzneistoffes an einen kolloidalen Träger kann beispielsweise die Wirkstofffreisetzung kontrolliert, die Stabilität des Arzneistoffes verbessert oder eine gewebespezifische Anreicherung erzielt werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Depotwirkung von Arzneimitteln nach subkutaner Applikation durch Nanopartikel erhöht wird und dass Substanzen kontinuierlicher aus ihrer Arzneiform freigegeben werden können (Kreuter 1983). Desweiteren sind Nanopartikel in der Lage, Substanzen, die über eine unzureichende physiologische Stabilität verfügen, zu stabilisieren. So wird eine Verbesserung der Stabilität von Nukleinsäure gegenüber Nukleasen durch die Bindung von Nukleinsäure an Nanopartikel erzielt (Bertling et al. 1991). Am Beispiel der Penetrationsfähigkeit von Arzneistoffen durch die Cornea des Auges in der Behandlung des Glaukoms wurde die Funktion der Nanopartikel als Trägersystem für Arzneistoffe untersucht. Hier wurde durch Kopplung der Nanopartikel an die Arzneistoffe eine verbesserte Penetration dieser durch die Cornea erzielt (Calvo et al. 1996 Zimmer et al. 1991, Zimmer et al. 1994). Schließlich wurde auch die Antigenität von Nanopartikeln ansatzweise am Beispiel von Albuminmikrosphären untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Jahr nach intravenöser Applikation keine erhöhten Antikörpertiter gegen Albuminmikrosphären nachweisbar sind (Barnhart et al. 1991).

Zur Bindung von Substanzen an Nanopartikel sind verschiedene Verfahren beschrieben worden. Auf der einen Seite ist es möglich, Wirkstoffe in den

---

Herstellungsprozess von Nanopartikeln mit einzubeziehen, so dass diese im Inneren des Partikels eingeschlossen sind. Zum Anderen sind die Absorption, die Ausnutzung der ionischen Wechselwirkung zwischen Nanopartikeloberfläche und der jeweiligen Substanz und die kovalente Bindung an die Oberfläche der Nanopartikel möglich (Allémann et al. 1993). Nanopartikel sind damit potenziell geeignet, als Mediatoren eines „Drug-Targeting“ (d.h. das gezielte Heranbringen eines Wirkstoffes an den gewünschten Zielort) zu fungieren, da sie beispielsweise von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) aktiv aufgenommen werden können. So reichern sich nach systemischer Applikation von Nanopartikeln diese zu 60-90% in Gewebemakrophagen der Leber an, zu 3-10% in denen der Lunge und Milz und zu einem geringen Prozentsatz im Knochenmark (Kreuter 1983). Diese Eigenschaft wurde beispielsweise ausgenutzt, um die Dosis bei der 50% der Patienten die erwartete Wirkung zeigen (ED 50) des Proteaseinhibitors Saquinavir durch Bindung an Nanopartikel in der antiretroviralen Therapie bei HIV zu senken (Bender et al. 1996). Gleiches gilt für die in vitro-Behandlung von der Leishmaniose durch Primaquin (Gaspar et al. 1992). Hierbei handelt es sich um passives „Drug-Targeting“, das auf einer unspezifischen Interaktion zwischen dem Zielgewebe und dem Trägersystem beruht, denn das MPS ist involviert in der Entfernung von Fremdkörpern aus dem Blutkreislauf (Allémann et al. 1993). So profitieren gerade schlecht zellmembrangängige Substanzen von der Bindung an Nanopartikel (Chavany et al. 1992).

Die Möglichkeit der Kopplung von Antikörpern auf der Nanopartikeloberfläche zur Detektion von Zellantigenen wurde das erste Mal 1987 am Beispiel der in vitro-Detektion von Zielantigenen durch antikörpergekoppelte Polymethacrylat-Nanopartikeln auf der Zelloberfläche von humanen T-Lymphozyten beschrieben (Rolland et al. 1987, Akasaka et al. 1988). Durch den Nachweis der Möglichkeit einer spezifischen und effizienten Bindung von antikörpergekoppelten Nanopartikeln auf der Zelloberfläche von selektiven Zielzellen ist eine spezifische Zelldetektion beispielsweise von Tumorzellen und eine richtungsweisende Medikamentenapplikation mit Nanopartikeln als Transporter möglich (Nobs et al. 2006). Um eine ideale Bindung von Antikörpern auf der Nanopartikeloberfläche mit anschließender spezifischer Rezeptor-Liganden Bindung zu erzielen und eine möglichst geringe Anzahl an unspezifischen Bindungs- und

---

Akkumulationsreaktionen *in vivo* zu erreichen, sollten die verwendeten Nanopartikel eine bestimmte Größenordnung, die zwischen 100 nm und 200 nm liegt, nicht überschreiten. Ist dies der Fall, werden sie aufgrund immunologischer Opsonierung schneller phagozytiert und abgebaut. Sind die Nanopartikel kleiner als 100 nm besteht die Möglichkeit, dass sie durch das Endothel der Sinusoide in die Leber gelangen und dort akkumulieren (Harashima et al. 1994).

#### **1.2.2.1 Gelatinenopartikel**

Gelatinenopartikel wurden bereits durch Desolvatisierung des gelösten Proteins mittels Aceton und anschließender Quervernetzung unter Verwendung von Glutaraldehyd hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren wurde erstmals 1978 von J.J. Marty beschrieben (Marty et al. 1978). 2004 konnte gezeigt werden, dass Gelatinenopartikel als spezifisches und effektives kolloidales Trägersystem fungieren können. Durch konfokale Lasermikroskopie wurde nachgewiesen, dass es zu einer spezifischen Bindung von antikörpergekoppelten Gelatinenopartikeln auf der Zelloberfläche von rezeptortragenden Tumorzellen und es anschließend zu einer rezeptorvermittelten Endozytose kommt (Wartlick et al. 2004). In einer weiteren Studie wurden im Jahr 2005 die Gelatinenopartikel auf ihrer Oberfläche mit Sulfonyl-Gruppen funktionalisiert und mit CD3-AK gekoppelt. Es konnte eine spezifische Detektion von CD3-positiven Leukämie-Zellen und primären T-Lymphozyten gezeigt und eine zelluläre Aufnahmerate der Gelatinenopartikel von 84% nachgewiesen werden (Balthasar et al. 2005, Dinauer et al. 2005). Aufgrund ihrer nachgewiesenen spezifischen Zelldetektion und ihrer guten Bioverfügbarkeit könnten Gelatinenopartikel zum gezielten Heranbringen eines Wirkstoffes an den gewünschten Zielort *in vivo* verwendet werden (Dinauer et al. 2005).

#### **1.2.2.2 Albuminnanopartikel**

Auch Albuminnanopartikel stehen im Mittelpunkt medizinischer Studien. Albuminnanopartikel können durch verschiedene Verfahren synthetisiert werden. Hierbei werden Albumine unterschiedlicher biologischer Herkunft verwendet, vor allem Albumin aus bovinem oder humanem Serum. Ein Herstellungsverfahren basiert auf Desolvatisierung des gelösten Proteins und anschließender Quervernetzung. Zur Quervernetzung wird das in Wasser gelöste Albumin durch

---

tropfenweise Zugabe von Ethanol oder Salzlösungen unter Rühren ausgefällt. Dabei kommt es zum sogenannten „Aufrollen“ der Proteinketten. An der Oberflächenstruktur der entstehenden Partikel kann in weiteren Verfahren Glutaraldehyd fixiert werden (Kreuter 1983b, Weber et al. 2000a, Weber et al. 2000b), worüber die Albuminnanopartikel antikörpergekoppelt werden können. So wurden Albuminnanopartikel bereits mit thioliertem Trastuzumab, einem humanem monoklonalen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor), welcher sich auf der Zelloberfläche von u.a. Brustkrebszellen befindet, gekoppelt. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Trastuzumab gekoppelten Albuminnanopartikel spezifisch ihre Zielzellen (eine Zelllinie, die HER2-Rezeptoren überexprimiert) detektieren und durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Steinhauser et al. 2006). Diese Ergebnisse stellen eine Basis für die Entwicklung eines Trägersystems zum spezifischen „Drug Targeting“ in Tumorzellen dar. In einem nächsten Schritt wurden die mit Trastuzumab gekoppelten Albuminnanopartikel mit dem Zytostatikum Doxyrubicin beladen und es konnte zum ersten Mal das gezielte Heranbringen eines Wirkstoffes, hier Doxyrubicin, an den für ihn vorbestimmten spezifischen Wirkungsort, hier eine HER2-überexprimierende Zelllinie, gezeigt werden (Anhorn et al. 2008). Nur Albuminnanopartikel, die sowohl mit Arzneistoff (dem Zytostatikum Doxyrubicin) beladen waren, als auch auf ihrer Oberfläche den passenden Liganden (HER2-AK) trugen, waren imstande, den gebundenen Arzneistoff in den Brustkrebszellen anzureichern und freizusetzen (Spänkuch et al. 2008). Dies führte letztlich zu einer spezifischen Abtötung von Tumorzellen, die das HER2-Antigen auf ihrer Oberflächen aufweisen, wohingegen „Nichtzielzellen“ in deutlich geringerem Maß betroffen waren. Demzufolge ist es möglich, ein Medikament an seinen spezifischen Wirkungsort mittels Nanopartikeln heranzubringen und unter Umständen auftretende systemische Nebenwirkungen des Medikaments an anderen Geweben und Organen zu reduzieren. Durch die Verwendung von Proteinen als Partikelmatrix kann ein schneller Abbau und damit eine schnelle Wirkstofffreisetzung, nachdem die Nanopartikel von Zellen aufgenommen wurden, ermöglicht werden.

Auch zum gezielten Arzneistofftransport über die Bluthirnschranke (BHS) sind Albuminnanopartikel von großem Nutzen. Es wurden Albuminnanopartikel

---

entwickelt, die Arzneistoffe in das Gehirn transportieren können. Als Ligand zur Überwindung der BHS wurde Apolipoprotein E (ApoE) eingesetzt. ApoE ist ein Ligand des LDL-Rezeptors, der sich auf den Membranoberflächen von Hirndothelzellen befindet. Es konnte in Studien in vitro und in vivo am Tier gezeigt werden, dass mit Hilfe von ApoE-gebundenen Nanopartikeln ein konzentrationsabhängiger Wirkstofftransport von Arzneimitteln, welche die physiologische Barriere der BHS ohne Transportsystem nicht überwinden können, in das Gehirn möglich ist (Michaelis et al. 2006). Diese Ergebnisse geben Hoffnung auf eine medikamentöse Therapie von Gehirntumoren, die mit etablierten Darreichungsformen bisher nicht möglich ist.

In der Kontrast-Echokardiographie wird das Handelspräparat Optison<sup>®</sup> eingesetzt. Optison<sup>®</sup> ist eine Injektionssuspension, welche Mikrosphären (winzige Bläschen) aus hitzebehandeltem menschlichem Albumin (Humanalbumin) enthält, die Perflutren gas als wirksamen Bestandteil enthalten. Nach Injektion wandert das Ultraschallkontrastmittel über die Venen zum Herzen. Da die gasgefüllte Mikrosphären aus Albumin bei einer Ultraschalluntersuchung andere Echosignale als die umgebenden Gewebe erzeugen, erhält man bei der Echokardiographie einen besseren Kontrast zwischen dem Bereich, in dem sich die Gasbläschen befinden (wie etwa die Herzkammern) und dem umgebenden Gewebe, z.B. einem Thrombus. Dadurch können die endokardialen Grenzen des Herzens besser dargestellt werden. Das Gas wird anschließend über die Lungen wieder ausgeatmet.

### **1.2.2.3 Eisenoxidhaltige Nanopartikel**

Einige Nanopartikel als kolloidale Trägersysteme befinden sich bereits in der klinischen Anwendung, beispielsweise in der Tumorthherapie oder in der Diagnostik (Thiesen und Jordan 2008). In Tumordiagnostik und Tumorthherapie werden eisenoxidhaltige Nanopartikel eingesetzt. Diese werden zur Hyperthermie-Behandlung von soliden Tumoren verwendet. Zu diesem Zweck werden die magnetischen Eisenoxid-haltigen Nanopartikel in den Tumor injiziert und das Tumorgewebe zunächst durch Anlegen eines magnetischen Wechselfeldes erwärmt (Thiesen und Jordan 2008). Abhängig von der erzielten Temperatur und Zeitdauer der Erwärmung werden die Tumorzellen entweder direkt abgetötet oder ihre Sensitivität gegenüber konventioneller Radio- oder Chemotherapie gesteigert.

---

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Voraussetzungen zur Herstellung eines molekularen Kontrastmittels basierend auf AK-gekoppelten, fluoreszierenden Polystyrolnanopartikeln zur spezifischen Antigendetektion am Beispiel der Dilatativer Kardiomyopathie. Es wird ein „Proof of the principle“, ein Nachweis der grundsätzlichen Wirksamkeit der Kopplung von AK an Polystyrolnanopartikel und einer folglich spezifischen Zielzeldetektion, statuiert.

Es soll ein Verfahren etabliert werden zur spezifischen Antigendetektion von aminofunktionalisierten, antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln in vitro. Ziel ist es, damit eine Grundlage für die Entwicklung eines molekularen Kontrastmittels basierend auf fluoreszierenden, aminofunktionalisierten, antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikel zu schaffen, welches in vivo zur spezifischen Detektion von inflammatorischem Herzmuskelgewebe in der Diagnostik der Dilatativen Kardiomyopathie verwendet werden kann. Die zu detektierenden Zielantigene in vivo befinden sich auf CD3+-Lymphozyten.

Ziel dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, Polystyrolnanopartikel stabil mit Antikörpern zu koppeln. Zuvor soll ein für die Kopplung optimal funktionalisierter Nanopartikel, welcher die minimalste unspezifische Bindungstendenz besitzt, gefunden werden. Letztendlich soll gezeigt werden, dass eine spezifische Antigendetektion durch ein auf aminofunktionalisierten, fluoreszierenden Polystyrolnanopartikeln basierendes Kontrastmittel prinzipiell möglich ist. Dazu sollen IgG-AK an die funktionalisierten Oberflächen der Polystyrolnanopartikel gekoppelt werden, welche spezifisch die antigenpräsentierenden Zellen detektieren sollen.

Die antigentragenden Zielzellen sollen mittels FACS-Analyse, Konfokaler Laserscanmikroskopie und Elektronenmikroskopie identifiziert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

#### 2.1.1 Zellen

Jurkat-Zellen

DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D

Mutz-2-Zellen

DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D

K5637 Zellen

DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D

#### 2.1.2 Zellkultur

Alpha Modifiziertes-Eagle`s Medium (alpha-MEM)

Invitrogen, Carlsbad, USA

Fetales Kälberserum (FSC)

HyClone, South Logan, USA

RPMI 1640

PAA Laboratories GmbH, Pasching, USA

#### 2.1.3 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin

Invitrogen, Carlsbad, USA

#### 2.1.4 Antikörper

Monoclonal mouse anti-human, CD2

Dako GmbH, Hamburg, D

Monoclonal mouse anti-human CD3 (TCR alpha/beta)

Dianova, Hamburg, D

IgG<sub>1</sub> anti-mouse, PE-conjugated

Becton Dickinson, Heidelberg, D

$\alpha$ - Aktin- AK

Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, D

CD34-AK

Becton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.1.5 Chemikalien

PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, USA
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, D

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon- Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS- Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

### 2.1.7 Geräte

Axioskop 2 plus	Carl Zeiss AG, Göttingen, D
Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, D
FACS-Callibur flow cytometer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Hera Safe	Heraeus, Hanau, D
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, D
Nikon Coolpix 990	Nikon, München, D
pH Meter pH 538	WTW, Weilheim, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohema, USA

### 2.1.8 Jurkat Medium

RPMI- 1640 Medium	88%
FSC	10%
PSG	2%

### 2.1.9 K5637 Medium

RPMI- 1640 Medium	89%
FSC	10%
PSG	1%

**2.1.10 Mutz-2 Medium**

Alpha- MEM- Medium	69%
FSC	10%
PSG	1%
Sterilfiltrierter Überstand von 5637-Zellen	20%

**2.1.11 PSG**

L- Glutamin	50% (v/v)
Penicillin Streptomycin	50% (v/v)

**2.1.12 Material zur Herstellung von Polystyrolnanopartikeln**

Die Herstellung der Polystyrolnanopartikel wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Organische Chemie III der Universität Ulm, geleitet von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester, von Frau Dr. Anna Musyanovych durchgeführt. Die von ihr verwendeten Materialien und Geräte werden hier kurz aufgelistet:

**2.1.12.1 Materialien**

Styrol wurde in Unterdruck destilliert und bei -20 °C gelagert. Alle weiteren verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel sind kommerzielle Produkte und werden ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

2-Aminoethyl-Methacrylat-Hydrochlorid (AEMH)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Hydrophobes Hexadekan	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Hydrophober Initiator 2,2'-azobis (2-Methybutyronitrile) (V-59)	Wako Chemicals, Osaka, Japan
Lutensol (AT-50)	BASF, Ludwigshafen, D
Methoxypolyethylenglykolacrylat M <sub>w</sub> 2000 g/mol (PEG-acr.)	SunBio Inc., Südkorea
Methoxypolyethylenglykolamine M <sub>w</sub> 5000g/mol (PEG-NH <sub>2</sub> )	Shearwater Polymer, Inc., USA
N-(2,6-diisopropylphenyl) Perylen-3,4-dicarbonacidimide (PMI)	BASF, Ludwigshafen, D
Styrol	Merck KGaA, Darmstadt, D

**2.1.12.2 Geräte**

PCD 02	Mütek GmbH, Herrsching , D
Sonifier W450 digital ( ½“)	Branson, Boston, USA
Spectrometer Lambda 16	PerkinElmer GmbH, Rodgau, D
Zeta Nanosizer	Malvern Instruments, Herrenberg, D

**2.1.13 Material zur Elektronenmikroskopie**

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Organische Chemie III, geleitet von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester, und der Zentralen Einrichtung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm, geleitet von Prof. Dr. Paul Walther, von Herrn Martin Daß durchgeführt. Die von ihm verwendeten Geräte werden hier kurz aufgelistet:

Bal-Tec CPD 030 (Kritisch-Punkt-Trockner)	Bac-Tec AG, Lichtenstein
High pressure freezer compact 1	Wohlwend GmbH, Sennwald, CH
Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-5200)	Hitachi High Technologies, Hilden, D
Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

**2.1.14 Material zur Laserscanmikroskopie**

Die Anfertigung der laserscanmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm, geleitet von Prof. Dr. med. Hubert Schrenzenmeier, von Frau Dr. rer. nat. Myriam Lorenz und PD Dr. med. Volker Mailänder durchgeführt. Die verwendeten Geräte werden hier kurz aufgelistet:

Konfokales Mikroskop (Fluoview FV300)	Olympus GmbH, Hamburg, D
Inverses Mikroskop (IX71)	Olympus GmbH, Hamburg, D

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultivierung**

Um eventuelle Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen und Hefen zu verhindern, wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen und mit steril filtrierten Lösungen in einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

#### **2.2.1.1 Jurkat-Zellen**

Die Leukämie-Zelllinie, die von humanen T-Zellen abstammt, wurde in 20 ml RPMI-Medium mit dem Zusatz von 10% FSC und 1% PSG bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Je nach Konfluenz erfolgte ein Medienwechsel, bei dem die Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert wurden. Kultiviert wurden die Zellen in gesättigter Wasserdampfatmosphäre.

#### **2.2.1.2 5637 Zellen**

Die humane Harnblasen-Karzinom-Zelllinie wurde in RPMI-Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Einmal pro Woche wurden die Zellen mit Trypsin im Verhältnis 1:10 gesplittet und dreimal pro Woche erfolgte ein Medienwechsel.

Zur Gewinnung und Aufreinigung des Überstandes der 5637 Zellen für die Mutz-2 Zellen, wurde das Medium der 5637 Zellen bei einer Konfluenz der Zellen um 100% abgenommen, bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend steril filtriert. Der Überstand kann mehrere Monate bei -20 °C eingelagert oder direkt als Supplement für das Medium der Mutz-2 Zellen verwendet werden.

#### **2.2.1.3 Mutz- 2 Zellen**

Die humane AML-Zelllinie wurde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt kultiviert. Als Nährmedium wurde das Alpha-MEM-Medium mit 10%-igem Zusatz von FSC und 20%-igem Zusatz von steril filtriertem Überstand von K5637-Zellen (s.o.) verwendet. Dreimal pro Woche erfolgte ein Medienwechsel. Bei einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen /ml wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet.

## 2.2.2 Durchflusszytometrische Auswertung (FACS-Analyse)

Um individuelle Zellen innerhalb eines Zellgemisches zu charakterisieren, wird häufig die Methode der Durchflusszytometrie (Fluorescent activated cell sorting) verwendet.

Hierbei werden die zu charakterisierenden Zellen einzeln nacheinander in einem Flüssigkeitshüllstrom (sheath fluid) an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das entstehende Streulicht nach vorne (FCS, forward scatter) und zur Seite (SSC, side scatter) wird von Detektoren erfasst. Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einem Punktwolkendiagramm („Dot-Plot“) dargestellt. Auf der X-Achse der gezeigten Diagramme ist der „Forward Scatter“ aufgetragen, welcher die Ablenkung des Laserstrahls in seiner Einfallrichtung angibt. Das individuelle Vorwärtsstreulicht gibt Aufschluss über die Größe der Zellen und ihre Oberflächenbeschaffenheit. Werden Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern markiert sind bzw. Zellen mit inkorporiertem fluoreszierendem Farbstoff (hier PMI) in das FACS-Gerät eingesetzt, so können diese Zellen aufgrund der emittierten Fluoreszenz, die von den Detektoren aufgenommen und verrechnet wird, über die Expression der Oberflächenproteine charakterisiert werden. Die daraus resultierende Fluoreszenzstärke ist auf der logarithmisch kalibrierten Y- Achse aufgetragen.

Da in die Polystyrolnanopartikel Perylenmonoimid (PMI), ein fluoreszierender Farbstoff, inkorporiert ist, mussten die Jurkat- und Mutz-2 Zellen nicht mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt werden. Die Zellen wurden bei RT für 5 min mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet anschließend mit 2 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellsuspension nochmals 5 min bei 1250 rpm pelletiert und anschließend in 50 µl PBS, versetzt mit  $10^{12}$  Polystyrol-Teilchen pro Ansatz, aufgenommen. Das Gemisch wurde 60 min im Schüttelinkubator bei RT und 300 rpm inkubiert. Es folgten 6 weitere Waschschrte mit jeweils 2 ml PBS und letztlich eine Resuspension in 500 µl PBS. Da nach Inkubation der CD2-gekoppelten Polystyrolnanopartikel mit den Jurkat-Zellen im Vergleich zu den nicht-AK gekoppelten Negativproben keine spezifische Antigendetektion nachgewiesen werden konnte, wurde der Versuchsaufbau geändert. In den folgenden Versuchsreihen wurden CD3-gekoppelte Nanopartikel nach Inkubation mit Jurkat-Zellen und CD34-gekoppelte Nanopartikel nach

Inkubation mit Mutz-2-Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten mit  $\alpha$ -Aktin gekoppelte Nanopartikel, die mit der jeweiligen Zelllinie inkubiert wurde.  $\alpha$ -Aktin ist ein Strukturprotein von glatten Muskelzellen. Es dient zur Charakterisierung und wird weder von den Jurkat-Zellen noch von den Mutz-2-Zellen expremiert. Deshalb kann  $\alpha$ -Aktin als Negativkontrolle für IgG-gekoppelte Antikörper verwendet werden. Nach geändertem Versuchsaufbau wurde nach einmaliger fünf Minuten langer Zentrifugierung mit 1250 rpm bei RT, der Überstand entfernt und in 50  $\mu$ l PBS, versetzt mit  $10^{12}$  Polystyrol-Teilchen pro Ansatz aufgenommen. Das Gemisch wurde für vier Stunden bei 37°C und mit 300 rpm inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit jeweils 2 ml PBS, und nach Resuspension in 500  $\mu$ l PBS erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung.

Die FACS-Auswertung erfolgte mit dem FACS-Calibur Flow Cytometer (Becton & Dickinson), das einen Argon-Ionen-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 $\pm$ 15 nm verwendet. Die Datenanalyse wurde mit der Cellquest Software Version 3.1 durchgeführt. Für die Messung der Nanopartikel wurde der Kanal FL1, der die grüne Farbe detektiert, verwendet. Tote Zellen wurden im „forward/sideward gating“ nicht mitgezählt, und es wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität durch PMI ermittelt. Da der PMI-Gehalt jeder Partikelcharge abhängig vom Herstellungsprozess unterschiedlich hoch ist, wurde der PMI-Gehalt der einzelnen Nanopartikel vor der Inkubation mit den Zielzellen gemessen. So wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der zuletzt durchgeführten Versuchsreihen mathematisch entsprechen dem zuvor gemessenen PMI-Gehalt korrigiert.

### **2.2.2.1 Verwendete Referenzproben**

#### 2.2.2.1.1 Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zellen als humane T-Zelllinie dienten als Positivkontrolle. Da Jurkat-Zellen sowohl CD2- als auch CD3-positive Zellen sind, werden sie nach Inkubation mit CD2- und CD3-gekoppelten Nanopartikeln als Positivkontrollen verwendet. Die Methode zur Bestimmung des prozentualen Anteils der antigenträgenden Zellen wird am Beispiel von CD2 erläutert.

In einem 5 ml FACS-Röhrchen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l PBS mit 10  $\mu$ l CD2-AK und 3  $\mu$ l IgG<sub>1</sub> -Anti-Mouse-PE-AK versetzt. Um bei der Analyse zwischen CD2-

positiven und CD2-negativen Zellen zu unterscheiden, wurden weitere  $10^6$  Zellen zur Kontrolle nur mit 3  $\mu\text{l}$  IgG<sub>1</sub>-Anti-Mouse-PE-AK markiert. Nach 30-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss wurden beide Ansätze mit 2 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet für die durchflusszytometrische Messung in 500  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte anhand eines Punktwolkendiagramms („Dot-Plot“). Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des IgG<sub>1</sub>-Anti-Mouse-PE-Antikörpers auf der Y-Achse und der FSC-Parameter auf der X-Achse dargestellt. Durch das Festlegen einer Fluoreszenzintensitätsschwelle konnten die CD2-positiven Zellen von den CD2-negativen Zellen abgegrenzt werden und der Anteil der CD2-positiven Zellen prozentual bestimmt werden (siehe Abbildung 5 im Ergebnissteil).

#### 2.2.2.1.2 Mutz-2 Zellen

Auch die Mutz-2-Zellen dienen nach Inkubation mit CD34-gekoppelten Nanopartikeln auf Grund ihres hohen Anteils an CD34-Antigenen auf der Zelloberfläche als Positivkontrolle. Die Methode der Bestimmung des prozentualen Anteils der CD34 positiven Zellen entspricht der oben beschriebenen Methode der direkten Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Auswertung (siehe Abbildung 7 im Ergebnissteil).

### 2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der sich im zu untersuchenden Präparat Fluorochrome befinden, die mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu leuchten beginnen. Die so angeregten Fluorochrome emittieren Licht, welches nach dem Stokes'schen Gesetz langwelliger als das anregende Licht ist. Das emittierte langwelligere Licht wird durch das Objektiv gesammelt, von dem sich im Strahlengang befindlichen Farbteiler vom anregenden Licht getrennt und in das Objektiv des Mikroskops mit der analog angeschlossenen Kamera geleitet.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, D) verwendet. Das Mikroskop verfügte über vier konventionelle Objektive (Plan-Neofluar, Carl Zeiss, D) mit 5x/0,15, 10x/0,30, 20x/0,50 und 40x/0,75 Vergrößerung zur Übersichtsdarstellung und einem Ölimmersionsobjektiv mit 100-facher Vergrößerung (100x/1,30). Zur

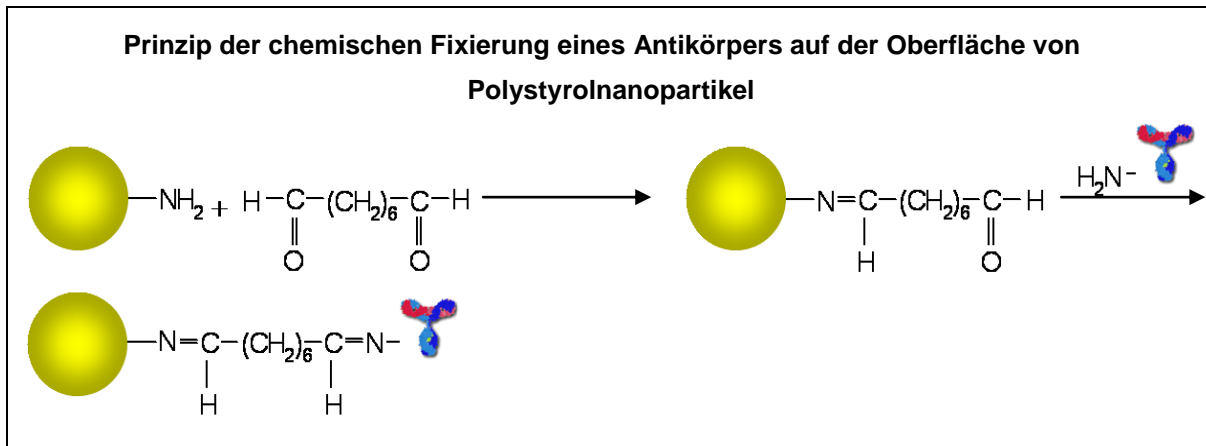


Fluoreszenzmikroskopie war es mit einem 5-fach Reflektorrevolver und einer justierbaren HBO-50 Lampe ausgestattet. Zur bildlichen Darstellung wurde eine Kamera (Nikon Coolpix 990), die mit dem Mikroskop verbunden war, benutzt. Die Bildanalyse erfolgte mit der Adobe Photoshop Elements Software Version 7.

#### **2.2.4 Herstellung von Polystyrolnanopartikeln**

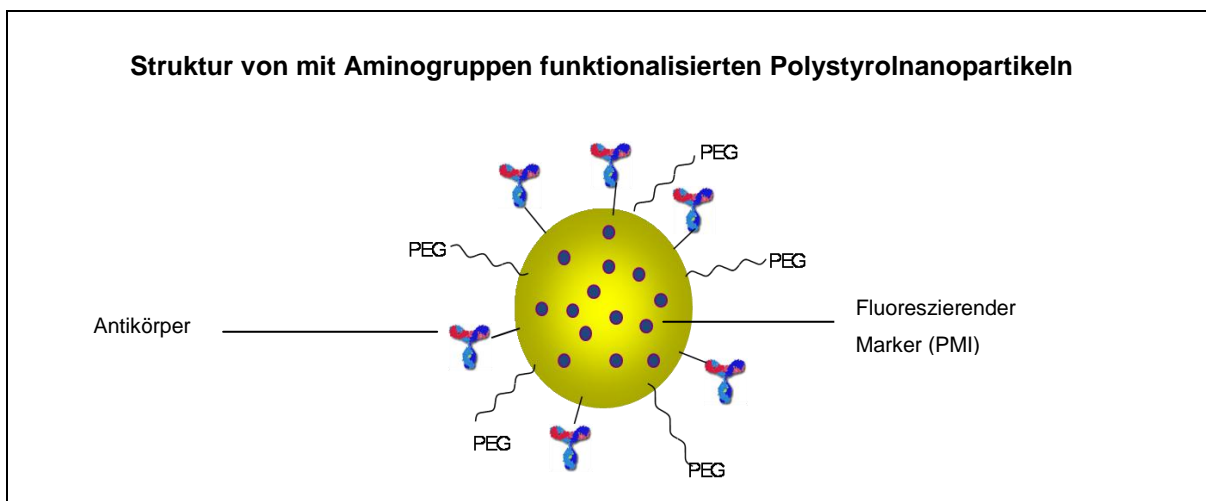
Die Herstellung der Polystyrolnanopartikel wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Organische Chemie III der Universität Ulm, geleitet von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester, von Frau Dr. Anna Musyanovych durchgeführt. Im Folgenden wird am Beispiel der zur spezifischen Zielzelldetektion verwendeten Polystyrolnanopartikel, eine kurze Beschreibung der Herstellungsprozesse gegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Polystyrolnanopartikel mit dem Verfahren der Miniemulsionspolymerisation (Musyanovych et al.2007) hergestellt. Da die Nanopartikel als Marker für Zellen eingesetzt werden sollten, wurden sie auf der Oberfläche mit Amino- und Carboxylgruppen funktionalisiert (Holzapfel et al. 2005). Chemisch ausgedrückt bedeutet Funktionalisierung hier nichts anderes als das Anbinden von funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche. Auf jedem Polystyrolnanopartikel befinden sich ca. 15.000 funktionelle  $\text{NH}_3^+$ -Gruppen. Zusätzlich wurden die Nanopartikel auf der Oberfläche mit Antikörpern gekoppelt. Um eine Verknüpfung zwischen Polystyrolpolymer und Antikörper herzustellen, wurde Glutaraldehyd verwendet (siehe Abbildung 2), welches mit den funktionellen Gruppen auf der Polymerpartikeloberfläche eine chemische Bindung eingeht. Das Verhältnis von den sich auf der Oberfläche der Polystyrolnanopartikel befindlichen Aminogruppen zu den Glutaraldehyd Molekülen beträgt 1:50.000, im Gegensatz dazu beträgt das Verhältnis der sich auf der Oberfläche der Polystyrolnanopartikel befindlichen Aminogruppen zu den Antikörpern 1.000:1.



**Abbildung 2:** In der Graphik ist das Prinzip der Antikörperkopplung der Styrolpolymere mit Glutaraldehyd als „Bindungsarm“ dargestellt. Die gelben Kugeln (●) sind die mit Aminogruppen funktionalisierten fluoreszierenden Polystyrolnanopartikel, welche durch Glutaraldehyd (H<sub>2</sub>N) mit verschiedenen Antikörpern (Y) gekoppelt werden können. (Musyanovych 2003, S. 105) (Vergleiche Ergebnissteil Kapitel 3.4.1)

Vereinfacht dargestellt, sieht ein fertig hergestelltes, fluoreszierendes, mit Aminogruppen funktionalisiertes Styrolpolymer, welches zusätzlich mit Polyethylenglykol-Ketten (PEG), zur Minimierung von unspezifischen Bindungsreaktionen abgebunden wurde (Owens und Peppas 2006), wie in Abbildung 3 dargestellt aus.



**Abbildung 3:** Vereinfachte Darstellung der Struktur eines antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikels, welcher mit Aminogruppen funktionalisiert wurde, einen eingebauten fluoreszierenden Farbstoff Perylen monoimid (PMI) besitzt und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungsreaktionen mit Polyethylenglykolketten (PEG) auf der Oberfläche versehen wurde. Graphik von Dr. Anna Musyanovych. (Vergleiche Ergebnissteil Kapitel 3.4.1)

### 2.2.4.1 Herstellung von aminofunktionalisierten Polystyrolnanopartikeln

Die mit Aminogruppen funktionalisierten Polystyrolpartikel mit inkorporierten fluoreszierendem Farbstoff (PMI) wurden mit dem Verfahren der freien radikalischen Copolymerisation in einem Miniemulsionssystem synthetisiert (Holzapfel et al. 2005, Musyanovych et al. 2007). Die in dieser Arbeit verwendete

Rezeptur ist in Tabelle 1 aufgelistet. Eine Mischung aus 5.88 g Styrol, 100 mg V-59, 250 mg hydrophoben Hexadekan und 3 mg PMI wurde in 24 g wässriger Phase, bestehend aus 0,12 g AEMH und 200 mg Lutensol AT-50 gegeben. Nach einer Stunde Voremulgierung, wurde die Mischung für 120 s in einem Eisbad mit Ultraschall (Brauson Sonifier W450, ½ Zoll Spitze) bei 90% Amplitude behandelt. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 rpm und einer Temperatur von 72 °C fand über einen Zeitraum von 20 h die Copolymerisation statt. Im Anschluss wurden die Partikel durch Zentrifugation von überschüssigem Lösungsmittel und wasserlöslichen, aminogruppenhaltigen Oligomeren gereinigt und in demineralisiertem Wasser resuspendiert.

#### **2.2.4.2 Herstellung von aminofunktionalisierten und mit PEG abgebundenen Polystyrolnanopartikeln**

Die mit Aminogruppen funktionalisierten und PEG gekoppelten Polystyrolpartikel mit inkorporiertem fluoreszierendem Farbstoff (PMI) wurden auch mit dem Verfahren der freien radikalischen Copolymerisation in einem Miniemulsionssystem synthetisiert. Die in dieser Arbeit verwendete Rezeptur ist in Tabelle 1 aufgelistet. Eine Mischung aus 5.88 g Styrol, 100 mg V-59, 250 mg hydrophobes Hexadekan und 3 mg PMI wurden in 24 g wässriger Phase bestehend aus 0,12 g AEMH und 0,15 g oder 0,3 g PEG-arc. gegeben. Nach einer Stunde Voremulgierung wurde die Mischung für 120 s in einem Eisbad mit Ultraschall (Brauson Sonifier W450, ½ Zoll Spitze) bei 90% Amplitude behandelt. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 rpm und einer Temperatur von 72 °C fand über einen Zeitraum von 20 h die Copolymerisation statt. Im Anschluss wurden die Partikel durch Zentrifugation vom überschüssigem Lösungsmittel und wasserlöslichen, aminogruppenhaltigen Oligomeren gereinigt und in demineralisiertem Wasser resuspendiert.

**Tabelle 1:** Rezeptur zur Herstellung von aminofunktionalisierten Polystyrolpartikeln im Miniemulsionsverfahren mit und ohne Zugabe von Polyethylenglykol (PEG). (AEMH: 2-Aminoethyl-Methacrylat-Hydrochlorid, V-59: Hydrophober Initiator 2,2'Azobis, PEG-acr.: Polyethylenglykolacrylat, NSL: N=Amino, S=Styrol, L=Lutensol, PMI: Perylen monoimid)

Bestandteile	Menge (g)	Kommentar
Styrol	5,88	Wurden zur Herstellung aller synthetisierten Partikel verwendet
AEMH	0,12	
Hydrophobes Hexadekan	0,25	
V-59	0,10	
PMI	0,003	
Lutensol	0,20	Wurde zur Herstellung der NSL-Partikel verwendet
	0,05	Wurde zur Herstellung der NSL-Partikel verwendet
PEG-acr.	0,15	Wurde zur Herstellung der NSL-Partikel verwendet
	0,30	Wurde zur Herstellung der NSL-Partikeln verwendet
Wasser	24	

### 2.2.4.3 Glutaraldehyd-Aktivierung von aminofunktionalisierten Polystyrol-nanopartikeln

Eine kovalente Bindung zwischen IgG und PEG auf der Oberfläche der aminofunktionalisierten Latexpartikel entstand mittels Glutaraldehyd-Aktivierung. Dazu wurden 2 ml (1,5 wt% Feststoff) aminofunktionalisierte Polystyrolpartikel, befindlich in einem Phosphatpuffer (pH 7,2) mit 0,25 ml aus einer 0,25 mg/ml haltigen Glutaraldehydlösung vermischt. Die Latex-Suspension wurde über einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C vermischt. Durch multiple Zentrifugierung wurde im Anschluss das ungebundene Glutaraldehyd von der Partikeloberfläche entfernt, und es erfolgte eine Resuspension in einem Phosphatpuffer (pH 7,2). Danach wurden die mit Glutaraldehyd vorbehandelten Partikel mit 0,03 mg IgG (d.h. CD2, CD3, CD34 und Alpha-Aktin) oder mit 10 mg PEG-NH<sub>2</sub> unter kontinuierlicher Rührung über einen Zeitraum von 20 h bei einer Temperatur von 4 °C vermischt. Durch Zentrifugierung wurde im Anschluss das ungebundene IgG von der Partikeloberfläche entfernt, und es erfolgte eine Resuspension in einem Phosphatpuffer (pH 7,2) (Musyanovych und Adler 2005).

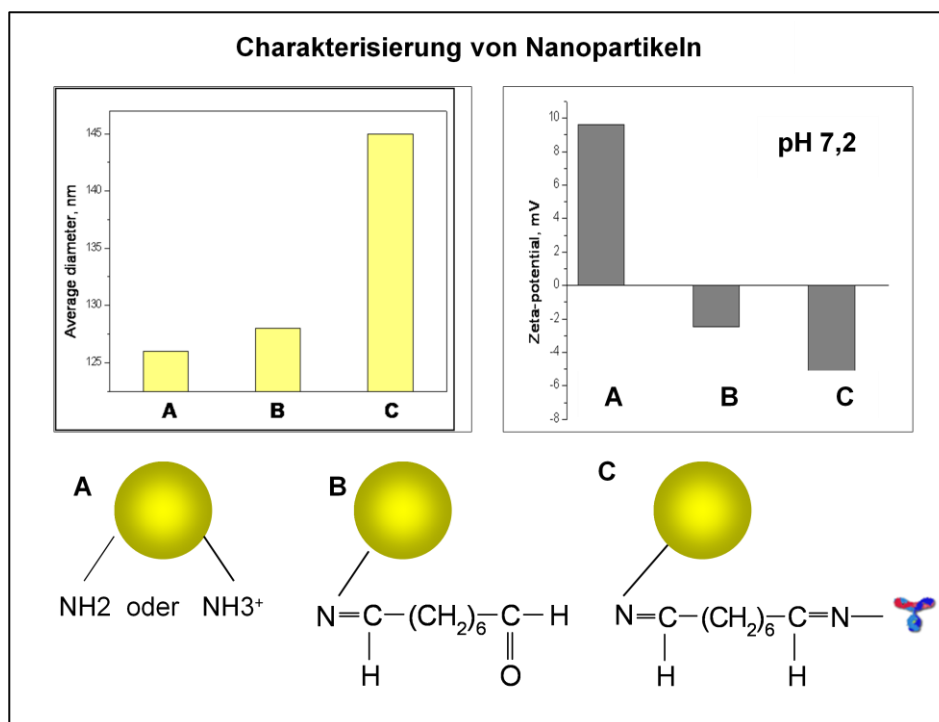
### 2.2.4.4 Charakterisierung der Polystyrolnanopartikel

Die durchschnittliche Größe und das Zeta( $\zeta$ )-Potential der Polystyrolnanopartikel wurden mit dem Zeta-Nanosizer gemessen. Die Grundlage für die  $\zeta$ -Potentialmessungen ist das Prinzip der Elektrophorese. Partikel bewegen sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes in einem Medium, in diesem Fall Wasser. Die Messung der Geschwindigkeit dieser Bewegung erlaubt Rückschlüsse auf die Ladung der Teilchen: je höher (bei gleichem Durchmesser der Partikel) die Ladung, desto höher ist die Geschwindigkeit der Teilchen. Bei der

Bewegung wird die elektrochemische Doppelschicht um das Teilchen abgestreift, es resultiert eine Ladung, die als  $\zeta$ -Potential gemessen wird.

Zur Messung des  $\zeta$ -Potentials wurde eine wässrige Lösung aus 1 mM KCl verwendet. Durch Titration des Strömungspotentials mittels dem PCD 02 wurde die Oberflächenladungsdichte bestimmt. Mit dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 16 wurde die Höhe des UV-Vis Absorptionsspektrums des eingekapselten, fluoreszierenden Farbstoffs (PMI) in den Latexpartikeln gemessen. Dazu wurden 7,8 mg einer getrockneten Latexmaterialprobe in 2,5 g THF gelöst und die Absorption der Lösung bei 490 nm, was dem Maximalpeak der PMI-Absorption entspricht, gemessen.

Abbildung 4 zeigt graphisch die Charakterisierung von drei verschiedenen Polystyrolnanopartikeln bezogen auf deren Größe und Durchmesser und das jeweilige Zetapotential.



**Abbildung 4:** Bildliche Darstellung der Charakterisierung von antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln am Beispiel des Immunglobulin G (IgG) Cluster of differentiation (CD) 34 Antikörpers (AK). Im linken Diagramm ist der durchschnittliche Durchmesser in der Maßeinheit nm von A) Polystyrolnanopartikeln mit  $\text{NH}_3^+$  bzw.  $\text{NH}_2$  gekoppelt, B) mit Aminogruppen funktionalisierten Polystyrolnanopartikeln und Glutaraldehyd und C) von mit CD34-AK gekoppelten Polystyrolnanopartikeln dargestellt. In dem rechten Diagramm ist das isoelektrische Potential der jeweiligen Polystyrolnanopartikel A)-C) in der Maßeinheit mV dargestellt. (Siehe Ergebnissteil Kapitel 3.4.1.5.)

### 2.2.4.5 Verwendete Polystyrolpolymere

Bei der manuellen Synthese von Polystyrolpolymeren entstehen in Volumen (V), Durchmesser ( $D_z$ ), Feststoffgehalt (C), Teilchenmenge und ihrer Funktionalität auf der Oberfläche variabel zusammengesetzte Polystyrolnanopartikel. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polystyrolnanopartikel und ihre individuellen Eigenschaften.

#### 2.2.4.5.1 Verwendete Nicht AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel

**Tabelle 2:** Nicht-Antikörper (AK) gekoppelte Polystyrolnanopartikel, welche für die Versuchsreihen ohne AK-Kopplung zur Bestimmung der Polymereigenfluoreszenzintensität verwendet wurden.

(N: Amino, PEG: Polyethylenglykol, S: Styrol, L oder Lut: Lutensol, PMI:Perylen monoimid, Gl.Ald: Glutaraldehyd, SPEG: Styrolpolyethylenglykol)

Probenbezeichnung	Feststoffgehalt (C)	Volumen (V)	Durchmesser (DZ)	Teilchenanzahl pro 1 $\mu$ l Probe	Oberflächenfunktionalisierung
Glycin=N0.5p-Glycin	1%	500 $\mu$ l	nicht gemessen	$9,83 \times 10^9$	Glycin
PEG-2	2,57%	200 $\mu$ l	nicht gemessen	$2,93 \times 10^{10}$	PEG
PEG-3	3,34%	200 $\mu$ l	nicht gemessen	$4,57 \times 10^{10}$	PEG
PEG-2a	2,44%	200 $\mu$ l	nicht gemessen	$2,34 \times 10^{10}$	PEG
PEG-3a	2,67%	200 $\mu$ l	nicht gemessen	$1,75 \times 10^{10}$	PEG
Glutaraldehyd =NSL-PMI2-Gl.Ald.	1%	700 $\mu$ l	144 nm	$6,11 \times 10^9$	Gl.Ald
SPEGa =NSL-SPEG LutPMI(t)	0,50%	1000 $\mu$ l	197 nm	$1,19 \times 10^9$	PEG+Lut.
SPEGb =NSL-SPEG LutPMI(d)	0,95%	700 $\mu$ l	621 nm	$7,19 \times 10^7$	PEG+Lut.
SPEGc=SPEG-PMI	0,60%	700 $\mu$ l	264 nm	$5,89 \times 10^8$	PEG
SL=SL-PMI	2,10%	nicht gemessen	270 nm	$1,97 \times 10^9$	S
SPEG_1	1,30%	1000 $\mu$ l	241 nm	$1,7 \times 10^9$	PEG
SPEG_1,5	0,70%	nicht gemessen	145 nm	$4,2 \times 10^9$	PEG
SPEG_3	0,90%	nicht gemessen	161 nm	$3,94 \times 10^9$	PEG

**Tabelle 3:** Nicht-Antikörper(AK) gekoppelte Polystyrolnanopartikel, welche für die Versuchsreihen mit AK-Kopplung als Negativkontrollproben verwendet wurden.

(N: Amino, S: Styrol, L: Lutensol, SPEG: Styrolpolyethylenglykol, PMI: Perylen monoimid, PEG: Polyethylenglykol, PBS: Phosphat buffered saline, SPSC: Styrol Polyethylenglykol Succinimidyl-Carbonat )

Probenbezeichnung	Feststoffgehalt (C)	Durchmesser (DZ)	Teilchenanzahl pro 1 $\mu$ l Probe	Oberflächenfunktionalisierung	PMI-Gehalt
SPEG_1	1,30%	241 nm	$1,7 \times 10^9$	SPEG	nicht gemessen
SPSC-PBS	1,4%	168 nm	$5,4 \times 10^9$	SPSC-PBS	nicht gemessen
SPSC-Glycin	1,4%	170 nm	$5,2 \times 10^9$	SPSC-Glycin	nicht gemessen
NSL-PBSa= NSL-2PMI-PBS	1,45%	259 nm	$1,5 \times 10^9$	NSL-PBS	nicht gemessen
NSL-PEGa= NSL-2PMI-PEG	1,35%	261 nm	$1,4 \times 10^9$	NSL-PEG	nicht gemessen
NSL-PBSb= NSL-2PMI-PBS	1,70%	241 nm	$2,2 \times 10^9$	NSL-PBS	0,27 mgPMI/gPolymer
NSL-PEGb= NSL-2PMI-PEG	1,50%	250 nm	$1,8 \times 10^9$	NSL-PEG	0,15 mgPMI/gPolymer
NSL-PBSc= NSL-2PMI-PBS	1%	197 nm	$2,4 \times 10^9$	NSL-PBS	0,22 mgPMI/gPolymer
NSL-PEGc= NSL-2PMI-PEG	1%	193 nm	$2,5 \times 10^9$	NSL-PEG	0,19 mgPMI/gPolymer
NSL-PEGd= NSL-2PMI-PEG	1,60%	182 nm	$4,9 \times 10^9$	NSL-PEG	0,19 mgPMI/gPolymer

### 2.2.4.5.2 Verwendete AK-gekoppelte Polystyrolpolymere

**Tabelle 4:** Verwendete Antikörper (AK) gekoppelte Polystyrolpolymere.

(SPEG: Styrolpolyethylenglykol, CD: Cluster of differentiation, SLPEG: Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol, NSL: N=Amino, S=Styrol, L=Lutensol, PMI: Perylen monoimid, IgG: Immunglobulin G, PEG: Polyethylenglykol)

Probenbezeichnung	Feststoffgehalt (C)	Durchmesser (DZ)	Teilchenanzahl pro 1 µl Probe	PMI-Gehalt	AK
CD2a=SPEG1_CD2	1,32%	252 nm	1,9x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD2
CD2b=SLPEG-CD2	2,05%	289 nm	1,5x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD2
SPSC-CD2	1,46%	167 nm	5,7x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD2
SPSC-CD34	1,5%	166 nm	6,0x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD34
CD3a=NSL-2PMI-IgG_2	1,20%	275 nm	1,1x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD3
CD3b=NSL-2PMI-IgG_2-PEG	1,45%	275 nm	0,8x10 <sup>9</sup>	nicht gemessen	CD3
CD3c=NSL-2PMI-IgG_3	0,95%	336 nm	0,5x10 <sup>9</sup>	0,09 mgPMI/gPolymer	CD3
CD3d=NSL-2PMI-IgG_2	1,50%	269 nm	1,4x10 <sup>9</sup>	0,07 mgPMI/gPolymer	CD3
CD3e=NSL-2PMI-IgG_2	0,80%	204 nm	1,7x10 <sup>9</sup>	0,07 mgPMI/gPolymer	CD3
CD3f=NSL-2PMI-IgG(CD3)	1,30%	189 nm	3,5x10 <sup>9</sup>	0,12mg PMI/gPolymer	CD3
CD34a=NSL-2PMI-IgG(CD34)	1,30%	244 nm	1,6x10 <sup>9</sup>	0,09 mgPMI/gPolymer	CD34
CD34b=NSL-2PMI-IgG(CD34)	0,90%	189 nm	2,4x10 <sup>9</sup>	0,08mg PMI/gPolymer	CD34
α-Aktin1=NSL-2PMI-IgG(Aktin)	0,60%	193nm	1,5x10 <sup>9</sup>	0,12mg PMI/gPolymer	Aktin
α-Aktin2= NSL-2PMI-IgG(Aktin)	1,60%	185 nm	4,6x10 <sup>9</sup>	0,16mg PMI/gPolymer	Aktin

## 2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Organische Chemie III, geleitet von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester, und der Zentralen Einrichtung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm, geleitet von Prof. Dr. Paul Walther, von Herrn Martin Daß durchgeführt.

### 2.2.5.1 REM

Die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein dünner Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über das abzubildende Objekt geführt, in dieser Arbeit über die eingetrocknete Suspension aus Jurkat- und Mutz-2-Zellen mit AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln. Dabei werden Sekundärelektronen, das sind Elektronen aus der verwendeten Probe, detektiert. Die rasterelektronenmikroskopisch erzeugten Bilder sind Abbildungen der Objektoberflächen und weisen eine hohe Tiefenschärfe auf. In dieser Arbeit wurden sie zur Verifizierung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln an Jurkat- und Mutz-2-Zellen verwendet. Zur Anfertigung der

rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden die Jurkat-Zellen bei 37 °C und 300 rpm über einen Zeitraum von einer Stunde bzw. 3 h mit den AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen 75 µg/ml, 150 µg/ml und 300 µg/ml inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1250 rpm über fünf Minuten wurde der Überstand entfernt und es erfolgte eine Resuspension in 50 µl PBS. Die Zellen wurden mit 5%igem Glutaraldehyd fixiert, mit Propanolol (30%, 50%, 70% und 100%) entwässert und mit Kohlendioxid in einem Bal-Tec CPD 030 Kritisch-Punkt-Trockner getrocknet. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2nm Platin bedampft. Jeweils ein Tropfen der Suspension wurde auf einen mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Objektträger gegeben und mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert.

#### **2.2.5.2 TEM**

Die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder erfolgte mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM10. Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen, die mit einer spezifischen Beschleunigungsstrahlung (hier 80 kV) auf die zu untersuchende Probe treffen. In der Probe werden die Elektronen gestreut. Elektronen, die mit demselben Ausfallswinkel wie Einfallswinkel das Objekt verlassen, werden in der hinteren Brennebene der Objektivlinse in einem Punkt fokussiert und es entsteht ein Bild. Zur Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder wurden die Jurkat- und Mutz-2-Zellen bei 37 °C und 300 rpm über einen Zeitraum von vier Stunden mit den AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1250 rpm über einen Zeitraum von fünf Minuten wurde der Überstand entfernt, und es erfolgte eine Resuspension in 50 µl PBS. Die Probe wurde auf einer Saphirdisc mit PLL hochdruckgefroren und im Anschluss einer Gefriersubstitution unterzogen. Hierfür wurde ein Substitutionsmedium aus 0,2% Aceton mit Uranylacetat und 0,2% Osmiumtetroxid verwendet. Die Substitution erfolgte über 18 h mit einer Ausgangstemperatur von -90 °C und einer Endtemperatur von 0 °C. In Raumtemperatur wird die Probe erst mit Aceton, dann mit 50:50 EPON gewaschen. Es folgt eine Inkubation der Zellen über 2 h in Aceton und zur Einbettung wird die Zellsuspension mit 100% EPON über 12 h aufgefüllt. Nach



den 12 h wird die Probe erneut mit EPON aufgefüllt und kann nach ultradünner Schnittführung transmissionselektronenmikroskopisch analysiert.

### **2.2.6 Konfokale Laserscanmikroskopie**

Die Anfertigung der laserscanmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm, geleitet von Prof. Dr. Hubert Schrenzenmeier, von Frau Dr. rer. nat. Myriam Lorenz im Labor von PD Dr. med. Volker Mailänder durchgeführt.

Die Anfertigung der laserscanmikroskopischen Bilder erfolgte mit einem Fluoview FV300. Die konfokale Laserscanmikroskopie ist eine Variante der Fluoreszenzmikroskopie, bei der virtuell optische Schnitte durch die Probe erzeugt werden können. Diese Schnittbilder können im Anschluss durch geeignete Software, hier mit der Fluoview-Software, zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden. Zur Anfertigung der mit dem konfokalen Laserscanmikroskop angefertigten Bilder wurden die Jurkat- und Mutz-2-Zellen bei 37 °C und 300 rpm über einen Zeitraum von vier Stunden mit den AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1250 rpm über einen Zeitraum von fünf Minuten wurde der Überstand entfernt, und es erfolgte eine Resuspension in 50 µl PBS. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanmikroskop angefertigt, das mit einem IX71 mit zwei Lasern (488 nm und 543 nm) und einem Ölimmersionsobjektiv mit 60-facher Vergrößerung ausgestattet ist; die Darstellung erfolgte mit der Fluoview-Software. Der in die Polystyrolnanopartikeln eingebaute Fluoreszenzfarbstoff PMI wurde mit dem Laser bei 488 nm angeregt und im Kanal 1 detektiert (Dichromatischer Spiegel 570 nm, Grenzfilter 530 nm, Ergebnisse in einer Bandbreite zwischen 530-570 nm). Zur Darstellung der Zellmembranen wurden diese mit 10 µM RH414, einem fluoreszierenden Membranfarbstoff, angefärbt. Dieser Farbstoff wurde mit dem Laser bei 543 nm angeregt und im Kanal 2 detektiert (Dichromatischer Spiegel 570 nm, Grenzfilter 585 nm, Ergebnisse im Hochpassfilter bei 585 nm). Um eine Interaktion zwischen den beiden Detektionskanälen zu verhindern, wurden die Emissionssignale unabhängig voneinander im Serienmodus erfasst. Die laserscanmikroskopische Analyse erfolgte im Kalman Filtermodus.

### **2.2.7 Statistik**

Alle durchgeführten Versuche wurden unabhängig voneinander dreifach durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2007. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Generierung eines Kontrastmittels befasst wurden keine weiteren statistischen Tests durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Eigenfluoreszenz chemisch unterschiedlich zusammengesetzter Polystyrolnanopartikel ohne Antikörperkopplung und ihre unspezifischen Bindungseigenschaften nach Inkubation mit Jurkat-Zellen und Mutz-2-Zellen fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch untersucht. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den spezifischen Bindungseigenschaften von antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln. Dabei waren die spezifischen Bindungseigenschaften CD3-gekoppelter Polystyrolnanopartikel nach Inkubation Jurkat-Zellen (CD2+/CD3+) und die spezifischen Bindungseigenschaften CD34-gekoppelter Polystyrolnanopartikel nach Inkubation mit Mutz-2 Zellen (CD34+) von besonderem Interesse. So wurde die spezifische Detektion von Antigenen durch antikörpergekoppelte Polystyrolnanopartikel durchflusszytometrisch untersucht. Zur Lokalisation der Partikel auf oder in den Zielzellen wurden Bilder der Antigen-Antikörper-Bindung mit einem Rasterelektronenmikroskop, einem Transmissionselektronenmikroskop und einem Konfokalen Laserscanmikroskop angefertigt.

Die Arbeitsschritte seien hier im Überblick noch einmal kurz zusammengefasst.

- I. Eigenfluoreszenz der Polystyrolnanopartikeln
- II. Kopplung der Polystyrolnanopartikel mit verschiedenen Stoffen zur Reduktion unspezifischer Bindungen (Glycin, PEG ect.)
- III. Bestimmung der Bindungseigenschaften der antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln
  - CD2-Antikörper auf Jurkat-Zellen (CD2+/CD3+)
  - CD3-Antikörper auf Jurkat-Zellen (CD2+/CD3+)
  - CD34-Antikörper auf Mutz-2-Zellen (CD34+)
- IV. Bildlicher Nachweis der Polymer-Antigen-Kopplung auf den Zielzellen

Zu Beginn wurden die mit Aminogruppen ( $\text{NH}_3$ ) funktionalisierten Polystyrolnanopartikel ohne Antikörperkopplung in jeweils drei unterschiedlichen, unabhängigen Versuchsreihen fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch auf die Intensität ihrer fluoreszierenden Eigenschaften und

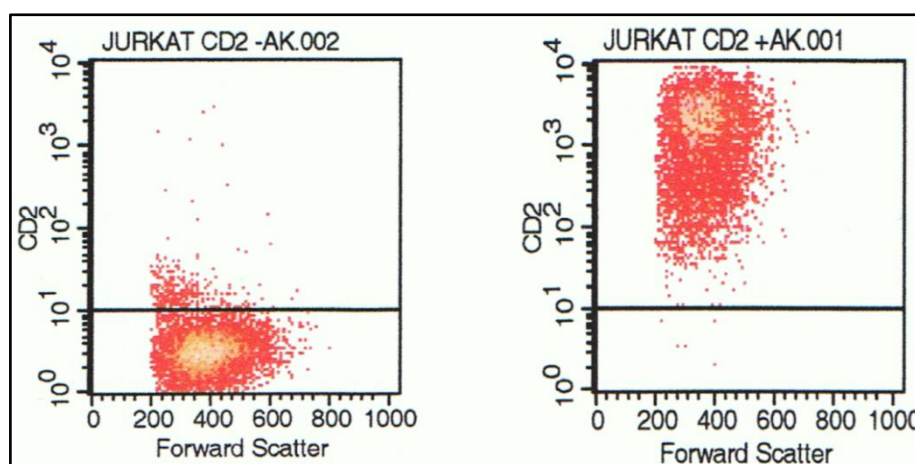
ihrer unspezifischen Bindungseigenschaften untersucht. Nach Detektion des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten Eigenfluoreszenzintensität und der geringsten unspezifischen Bindungstendenz wurde dieses mit verschiedenen IgG-AK-gekoppelt und in jeweils drei unterschiedlichen unabhängigen Versuchsreihen auf seine spezifischen Bindungseigenschaften gegenüber den CD2- und CD3-positiven Jurkat-Zellen und den CD34-positiven Mutz-2-Zellen durchflusszytometrisch, elektronenmikroskopisch und mit einem konfokalen Laserscanmikroskop untersucht.

### 3.1 Verwendete Positivkontrollen

#### 3.1.1 Jurkat-Zellen CD2+

Die Auswertung der FACS-Analyse, welche nach direkter Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung des prozentualen Anteils der CD2-positiven Jurkat-Zellen durchgeführt wurde, ergab das in Abbildung 5 dargestellte Punktwolkendiagramm.

Hier lag der prozentuale Anteil der CD2+-positiven Jurkat-Zellen bei 95,52%. Damit erwiesen sich die Jurkat-Zellen als eine, für die geplanten Versuchsreihen geeignete Zelllinie und konnten in den folgenden Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendet werden.



**Abbildung 5:** „Dot Plot“-Darstellung der fluoreszierenden Zellen der Kontrolle ohne Zugabe des Cluster of Differentiation 2 (CD2)-Antikörpers (AK) (links) und der Probe mit Zugabe des CD2-AK (rechts). Anhand der Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (waagerechte Linie) werden die Zellen oberhalb als CD2- positiv, die unterhalb als CD2-negativ definiert. Da die positiven Ergebnisse in der Kontrolle auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind, ergibt sich die Reinheit der CD2-positiven Zellen aus der Differenz des Anteils in der Probe unter Zugabe des CD2-AK abzüglich des Anteils der unspezifischen Ereignisse in der Kontrolle ohne CD2-AK Zugabe. Hier lag der prozentuale Anteil der CD2-positiven Zellen bei  $99,93\% - 4,41\% = 95,52\%$ .

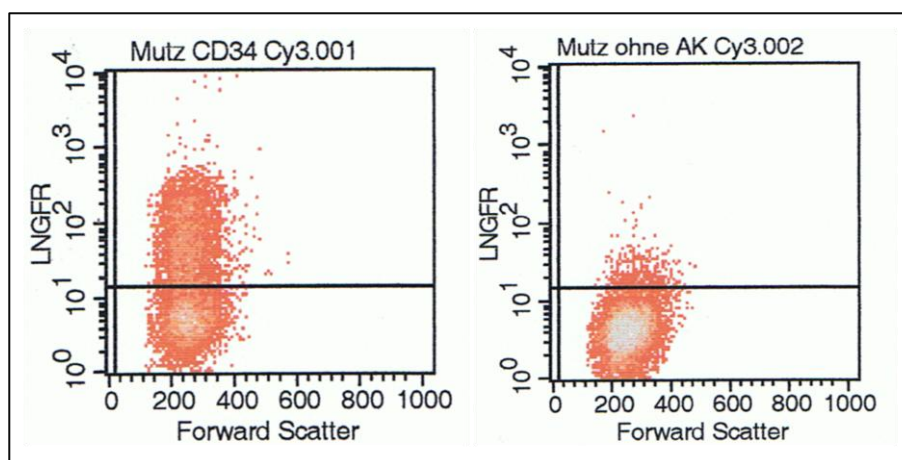
### 3.1.2 Jurkat-Zellen CD3+

Ein prozentuale Anteil der CD3+-positiven Jurkat-Zellen von 98,2% wurde aufgrund vorliegender Literatur vorausgesetzt (Dinauer et al. 2005). Damit eigneten sich die Jurkat-Zellen als eine, für die geplanten Versuchsreihen mit CD3-AK geeignete Zelllinie und konnten in den folgenden Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendet werden.

### 3.1.3 Mutz-2-Zellen CD34+

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der CD34+-positiven Mutz-2-Zellen wurde nach direkter Immunfluoreszenzfärbung eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Auswertung der FACS-Analyse ergab das in Abbildung 7 dargestellte Punktwolkendiagramm.

Hier lag der Anteil der CD34 positiven Mutz-2-Zellen bei 45,57%. Somit konnten die Mutz-2-Zellen in den durchgeführten Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendet werden.



**Abbildung 7:** „Dot Plot“-Darstellung der fluoreszierenden Zellen der Kontrolle ohne Zugabe des Cluster of differentiation 34 (CD34)-Antikörpers (AK) (links) und der Probe mit Zugabe des CD34-AK (rechts). Anhand der Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (waagerechte Linie) werden die Zellen oberhalb als CD34-positiv, die unterhalb als CD34-negativ definiert. Da die positiven Ergebnisse in der Kontrolle auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind, ergibt sich die Reinheit der CD34-positiven Zellen aus der Differenz des Anteils in der Probe unter Zugabe des CD34-AK abzüglich des Anteils der unspezifischen Ereignisse in der Kontrolle ohne CD34-AK Zugabe. Hier lag der prozentuale Anteil der CD34-positiven Mutz-2-Zellen bei  $50,77\% - 5,20\% = 45,57\%$ .

## 3.2 I: Eigenfluoreszenz der Polystyrolnanopartikel

Nach Funktionalisierung der Polystyrolnanopartikel mit Aminogruppen ( $\text{NH}_3$ -Gruppen) und anschließender Antikörperkopplung sind einige der  $\text{NH}_2$ -Gruppen über den Glutalaldehyd-Linker mit den verwendeten Antikörpern gekoppelt und

---

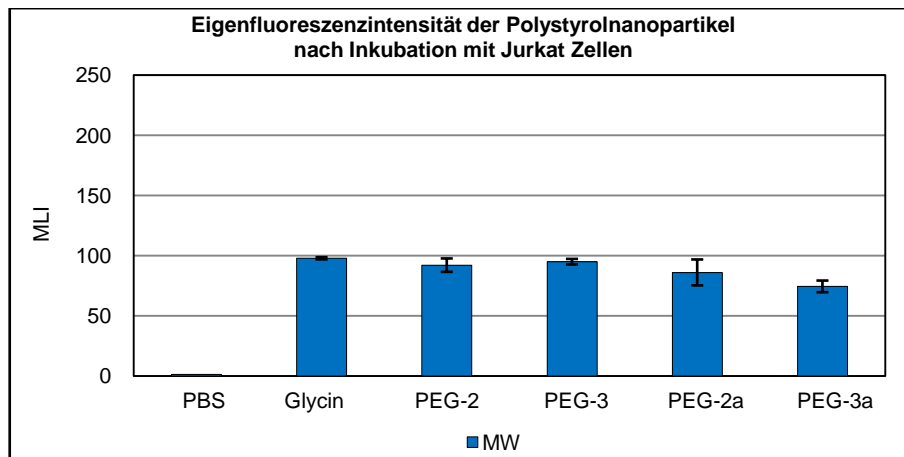
andere stehen frei im Raum. Die freien Aminogruppen sind z.T. positiv geladen ( $\text{NH}_3^+$ ) und binden unspezifisch an negativ geladene Zellbestandteile. Um eine auf diese Weise entstehende unspezifische Bindungstendenz zu minimieren, werden die freien Enden der Aminogruppen mit verschiedenen chemischen Stoffen wie Glycin oder PEG abgebunden.

Zum Nachweis der unspezifischen Bindungseigenschaften der mit  $\text{NH}_3$  funktionalisierten Polystyrolnanopartikel, wurde die Intensität der Eigenfluoreszenz durchflusszytometrisch nach Inkubation der Jurkat- bzw. Mutz-2-Zellen mit den funktionalisierten Polystyrolnanopartikeln nach entsprechender Versuchsvorbereitung (s.o.) gemessen.

### **3.3 II: Kopplung der Polystyrolnanopartikel mit verschiedenen Stoffen zur Reduktion unspezifischer Bindungen**

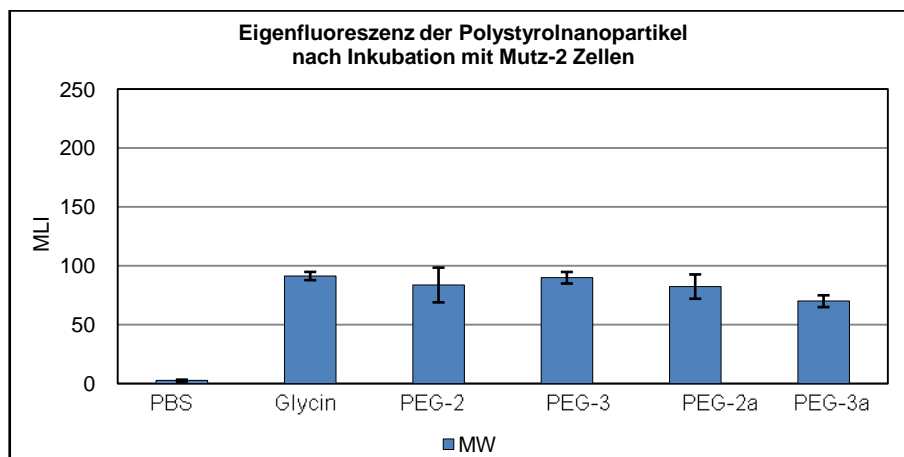
#### **3.3.1 Eigenfluoreszenz von mit Glycin und PEG gekoppelten Polystyrolnanopartikel**

Die verwendeten Polystyrolnanopartikel wurden zur Minimierung der unspezifischen Bindungstendenzen mit Glycinseitenketten (Glycin (n=6)) und mit Polyethylenglykoseitenketten (PEG) mit unterschiedlichem Feststoffgehalt (PEG-2 (n=6), PEG-3 (n=6), PEG-2a (n=6), PEG-3a (n=6)) gekoppelt. PBS wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Auswertung der Mittelung der Messreihen der durchflusszytometrisch bestimmten Eigenfluoreszenz ergab die in Abbildung 8 graphisch dargestellten Werte nach Inkubation mit Jurkat-Zellen und die in Abbildung 9 graphisch dargestellten Werte nach Inkubation mit Mutz-2-Zellen.



**Abbildung 8:** Fluoreszenzintensitäten (n=6) mit Standardabweichungen von Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen zur Identifizierung der Polystyrolnanopartikel mit der geringsten unspezifischen Bindungstendenz. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

In den Versuchen wurden folgende Polystyrolnanopartikel verwendet: Glycin (Glycin-Funktionalisierung, C=1%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $9,83 \times 10^9$ ), PEG-2 (Polyethylenglykol (PEG)-Funktionalisierung, C=2,57%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,93 \times 10^{10}$ ), PEG-3 (PEG-Funktionalisierung, C=3,34%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $4,57 \times 10^{10}$ ), PEG-2a (PEG-Funktionalisierung, C=2,44%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,34 \times 10^{10}$ ), PEG-3a (PEG-Funktionalisierung, C=2,67%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,75 \times 10^{10}$ ). Als Negativkontrolle wurde Phosphat buffered saline (PBS) nach Inkubation mit den Jurkat-Zellen verwendet. PMI: Perylen monoimid.

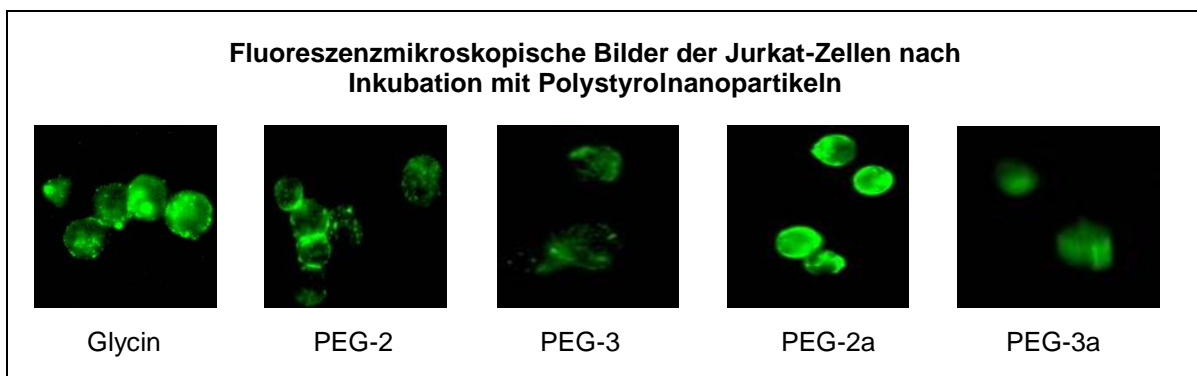


**Abbildung 9:** Fluoreszenzintensitäten (n=6) mit Standardabweichungen von Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Mutz-2-Zellen zur Identifizierung des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten unspezifischen Bindungstendenz. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

In den Versuchen wurden folgende Polystyrolnanopartikel verwendet: Glycin (Glycin-Funktionalisierung, C=1%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $9,83 \times 10^9$ ), PEG-2 (Polyethylenglykol (PEG)-Funktionalisierung, C=2,57%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,93 \times 10^{10}$ ), PEG-3 (PEG-Funktionalisierung, C=3,34%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $4,57 \times 10^{10}$ ), PEG-2a (PEG-Funktionalisierung, C=2,44%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,34 \times 10^{10}$ ), PEG-3a (PEG-Funktionalisierung, C=2,67%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,75 \times 10^{10}$ ). Als Negativkontrolle wurde Phosphat buffered saline (PBS) nach Inkubation mit den Mutz-2-Zellen verwendet. PMI: Perylen monoimid.

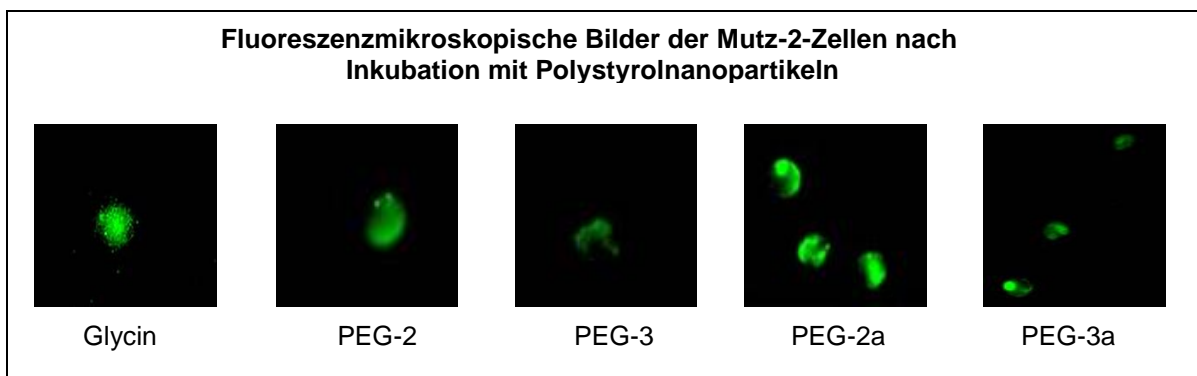
Nach der Mittelung der Messreihen der durchflusszytometrisch bestimmten Eigenfluoreszenz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Eigenfluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel mit Glycin-Funktionalisierung und der Polystyrolnanopartikel mit PEG-Funktionalisierung festgestellt werden.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Proben angefertigt. In Abbildung 10 sind die Jurkat-Zellen und in Abbildung 11 die Mutz-2-Zellen nach Inkubation mit den mit PEG- oder Glycin-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln auf fluoreszenzmikroskopisch erfassten Bildern zu sehen.



**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen der Jurkat-Zellen nach Inkubation mit den mit Glycin und Polyethylenglykol (PEG) gekoppelten Polystyrolnanopartikeln

In den Proben verwendete Polystyrolnanopartikel: Glycin (Glycin-Funktionalisierung, C=1%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $9,83 \times 10^9$ ), PEG-2 (PEG-Funktionalisierung, C=2,57%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,93 \times 10^{10}$ ), PEG-3 (PEG-Funktionalisierung, C=3,34%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $4,57 \times 10^{10}$ ), PEG-2a (PEG-Funktionalisierung, C=2,44%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,34 \times 10^{10}$ ), PEG-3a (PEG-Funktionalisierung, C=2,67%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,75 \times 10^{10}$ ).



**Abbildung 11:** Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen der Mutz-2-Zellen nach Inkubation mit den mit Glycin und Polyethylenglykol (PEG) gekoppelten Polystyrolnanopartikeln.

In den Proben verwendete Polystyrolnanopartikel: Glycin (Glycin-Funktionalisierung, C=1%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $9,83 \times 10^9$ ), PEG-2 (PEG-Funktionalisierung, C=2,57%, Teilchenanzahl pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,93 \times 10^{10}$ ), PEG-3 (PEG-Funktionalisierung, C=3,34%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $4,57 \times 10^{10}$ ), PEG-2a (PEG-Funktionalisierung, C=2,44%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,34 \times 10^{10}$ ), PEG-3a (PEG-Funktionalisierung, C=2,67%, Teilchenmenge pro 1  $\mu\text{l}$  Probe  $2,75 \times 10^{10}$ ).

Auch auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern konnte kein signifikanter Unterschied in der Intensität und Spezifität der Fluoreszenz zwischen den einzelnen Polystyrolnanopartikeln mit Glycin-Seitenketten und den Polystyrolnanopartikeln mit den PEG-Seitenketten mit unterschiedlicher Teilchenanzahl und Feststoffgehalt (PEG-2, PEG-3, PEG-2a und PEG-3a), sowie

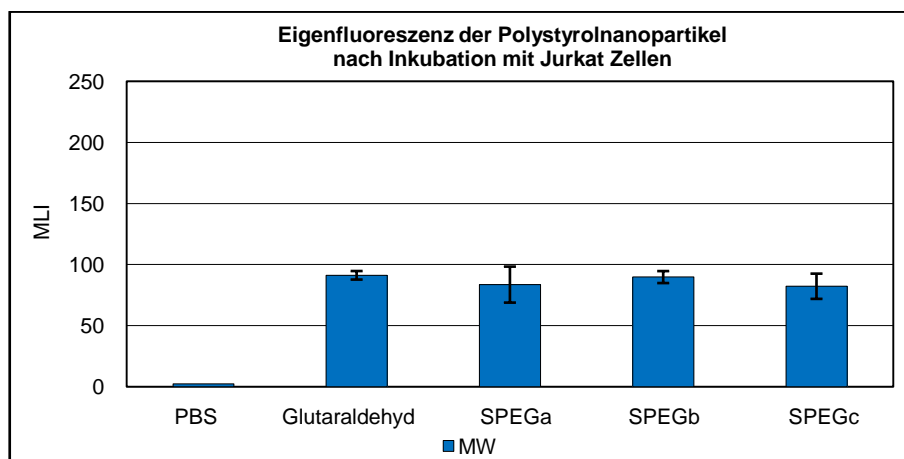


zwischen den Zelllinien festgestellt werden, so dass eine weitere Versuchsreihe zur Detektion des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten Eigenfluoreszenz durchgeführt wurde.

### 3.3.2 II: Eigenfluoreszenz von mit Glutaraldehyd und SPEG gekoppelten Polystyrolnanopartikeln

Da durch Kopplung der Polystyrolnanopartikel mit Glycin und PEG keine Minimierung der unspezifischen Bindungen der freien Aminogruppen nachgewiesen werden konnte, werden im folgenden Versuch die Polystyrolpolymere nur mit Glutaraldehyd als „Linker“ und mit Styrolpolyethylenglykolketten (SPEG) gekoppelt.

In Abbildung 12 werden die durchflusszytometrisch erzielten Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abbildung 12:** Fluoreszenzintensitäten ( $n=3$ ) mit Standardabweichungen von Polystyrolnanopartikel mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen zur Identifizierung des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten unspezifischen Bindungstendenz. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

In den Versuchen wurden folgende Polystyrolnanopartikel verwendet: Glutaraldehyd (Glutaraldehyd-Funktionalisierung,  $C=1\%$ ,  $D=144$  nm, Teilchenanzahl pro  $1 \mu\text{l}$  Probe  $6,11 \times 10^9$ ), SPEGa (Styrolpolyethylenglykol-Lutensol Funktionalisierung,  $C=0,5\%$ ,  $D=197$  nm, Teilchenanzahl pro  $1 \mu\text{l}$  Probe  $1,19 \times 10^9$ ), SPEGb (Styrolpolyethylenglykol-Lutensol Funktionalisierung,  $C=0,95\%$ ,  $D=621$  nm, Teilchenmenge pro  $1 \mu\text{l}$  Probe  $7,19 \times 10^7$ ), SPEGc (Styrolpolyethylenglykol- Funktionalisierung,  $C=0,6\%$ ,  $D=264$  nm, Teilchenmenge pro  $1 \mu\text{l}$  Probe  $5,89 \times 10^8$ ). Als Negativkontrolle wurde Phosphat buffered saline (PBS) nach Inkubation mit den Jurakt-Zellen verwendet. PMI: Perylen monoimid.

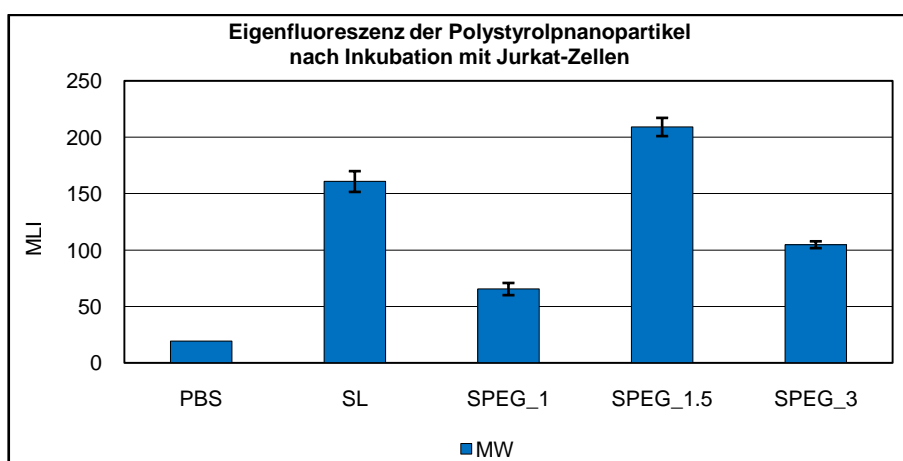
Nach Mittelung der Messreihen der durchflusszytometrisch bestimmten Eigenfluoreszenz der Polystyrolnanopartikel mit Glutaraldehyd als funktionelle Gruppe und den in Feststoffgehalt, Teilchenmenge und Durchmesser differenten Polystyrolnanopartikeln mit SPEG-Funktionalisierung zeigte sich, dass die Polystyrolnanopartikel, die chemisch mit Polyethylenglykolketten (SPEG)

gekoppelt wurden, tendenziell weniger Eigenfluoreszenzintensität und unspezifische Bindungseigenschaften aufweisen, als die „nackten“ Polystyrolnanopartikel, die mit Glutaraldehyd- (Gl.Ald.), Glycin- und nur Polyethylenglykol- (PEG) gekoppelt wurden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Polystyrolnanopartikel mit Styrolpolyethylenglykol (SPEG)- und Styrollutensol (SL) gekoppelt. Nach Inkubation mit Jurkat-Zellen wurden diese im Hinblick auf ihre Eigenfluoreszenz und ihre unspezifischen Bindungseigenschaften durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.3.3 II: Eigenfluoreszenz von mit SPEG und SL gekoppelten Polystyrolpolymeren

Zur Detektion des Polystyrolnanopartikels mit der minimalsten Neigung unspezifische Bindungen mit negativ geladenen Zellbestandteilen einzugehen, werden im folgenden Versuch die Polystyrolnanopartikel mit Styrollutensol (SL) (SL (n=3)) und mit Styrolpolyethylenglykol (SPEG\_1 (n=3), SPEG\_1,5 (n=3), SPEG\_3 (n=3)) gekoppelt. PBS wird als Negativkontrolle verwendet

Die Auswertung der Mittelung der Messreihen der durchflusszytometrisch bestimmten Eigenfluoreszenz der Polystyrolnanopartikel ergab die in Abbildung 13 graphisch dargestellten Werte nach Inkubation mit Jurkat-Zellen.



**Abbildung 13:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen zur Identifizierung des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten unspezifischen Bindungstendenz. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

In den Versuchsreihen wurden folgende Polystyrolnanopartikel verwendet: SL (Styrollutensol-Funktionalisierung, C=2,1%, D= 270 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $1,97 \times 10^9$ ), SPEG\_1 (Styrolpolyethylenglykol- Funktionalisierung, C=1,3%, D=241 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $1,7 \times 10^9$ ), SPEG\_1,5 (Styrolpolyethylenglykol- Funktionalisierung, C=0,7%, D=145 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $4,2 \times 10^9$ ). SPEG\_3 (Styrolpolyethylenglykol- Funktionalisierung, C=0,9%, D=161 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $3,94 \times 10^9$ ). Als Negativkontrolle wurde Phosphat buffered saline (PBS) nach Inkubation mit den Jurakt-Zellen verwendet. PMI: Perylen monoimid.

---

Nach graphischer Darstellung zeigte sich deutlich, dass im Vergleich zwischen den verschiedenen gekoppelten Polystyrolnanopartikeln (SL, SPEG\_1, SPEG\_1,5, SPEG\_3) die Polystyrolnanopartikel SPEG\_1 die geringste Eigenfluoreszenzintensität und die geringsten unspezifischen Bindungseigenschaften aufweisen. Diese Polystyrolnanopartikel wurden nun für die folgenden Versuchsreihen zur Bestimmung der spezifischen Bindungseigenschaften der Polystyrolnanopartikel mit CD2-, CD3-, CD34- und  $\alpha$ -Aktin-IgG-Antikörpern gekoppelt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wurden mit einem TEM, einem REM und einem Laserscanmikroskop Bilder der Zellen nach Inkubation mit den Polystyrolnanopartikeln angefertigt.

### **3.4 III: Bindungseigenschaften AK-gekoppelter Nanopartikel**

Zum Nachweis der spezifischen Bindungseigenschaften der mit unterschiedlichen Antikörpern gekoppelten Polystyrolnanopartikel wurden die Intensität der Fluoreszenz nach Inkubation mit Jurkat- bzw. Mutz-2 Zellen durchflusszytometrisch nach entsprechender Versuchsvorbereitung (s.o.) gemessen.

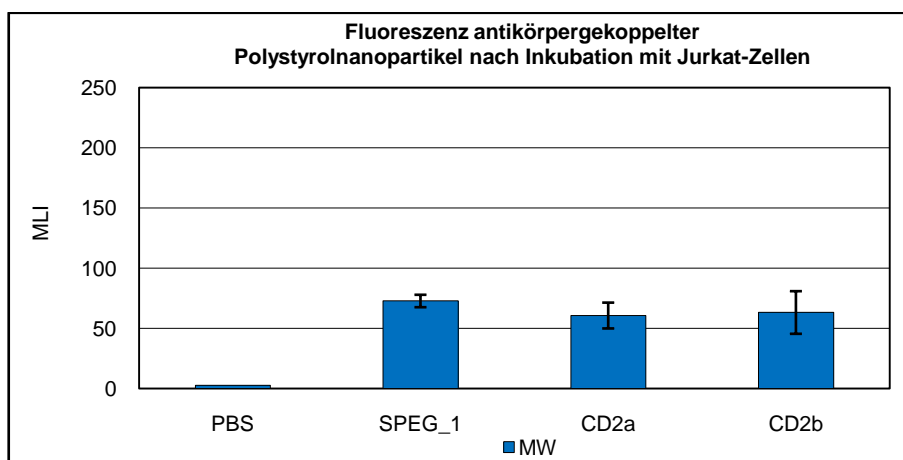
#### **3.4.1 Durchflusszytometrische Auswertungen der spezifischen Antigen-detektion**

##### **3.4.1.1 Bindungseigenschaften von CD2-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln**

Zur Minimierung der unspezifischen Bindungstendenz der freien Aminogruppen auf der Partikeloberfläche, wurden die verwendeten Polystyrolnanopartikel mit Styrollutensolpolyethylenglykol (CD2b) und mit Styrolpolyethylenglykol- (CD2a) gekoppelt. Zusätzlich wurden die Polystyrolnanopartikel mit CD2-Antikörpern gekoppelt.

Die Auswertung der Mittelung der Messreihen der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften von mit CD2-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln nach Inkubation mit Jurkat-Zellen ergab die in Abbildung 14 graphisch dargestellten Werte. Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-

gekoppelte Polystyrolnanopartikel mit Styrolpolyethylenglykol-Seitenketten (SPEG\_1 (n=6)) und PBS verwendet.



**Abbildung 14:** Fluoreszenzintensitäten (n=6) mit Standardabweichungen von AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

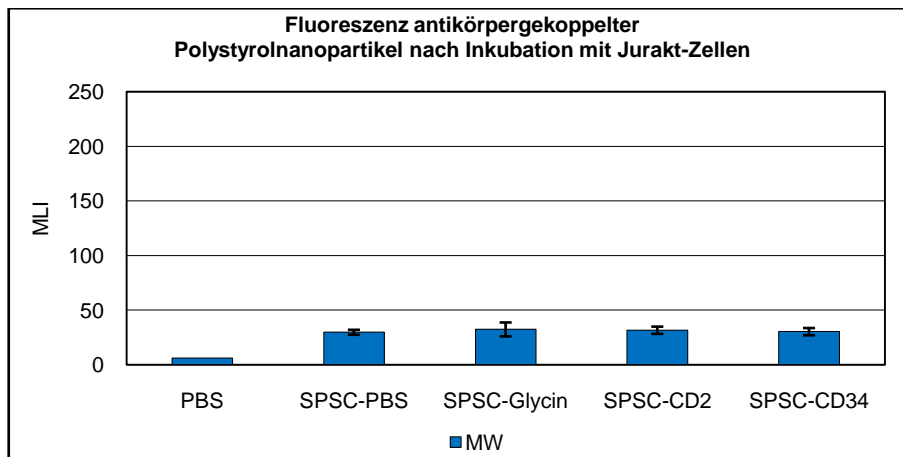
In den Versuchen wurden folgende mit Cluster of Differentiation 2 (CD2)-Antikörpern (AK) -gekoppelten Polystyrolnanopartikel verwendet: CD2a (Styrolpolyethylenglykol-Funktionalisierung, C=1,32%, D=252 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,9 \times 10^9$ ) und CD2b (Styrolpolyethylenglykol-Funktionalisierung, C=2,05%, D=289 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,5 \times 10^9$ ) verwendet. Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel SPEG\_1 (Styrolpolyethylenglykol-Funktionalisierung, C=1,3%, D=241 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,7 \times 10^9$ ) und Phosphat buffered saline (PBS) verwendet. PMI: Perylen monoimid.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel und den als Negativkontrolle verwendeten nicht AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln festgestellt werden. Anders als erwartet wiesen die nicht AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel SPEG\_1 eine höhere Fluoreszenzintensität als die AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel CD2a und CD2b auf. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die spezifischen Bindungseigenschaften von neu hergestellten Polystyrolnanopartikeln, welche mit Styrol-PEG-Succinimidyl-Carbonat (SPSC) ohne Antikörper und mit CD2- und CD34-AK gekoppelt wurden, nach Inkubation mit Jurkat- bzw. Mutz-2 Zellen bestimmt.

### 3.4.1.2 Bindungseigenschaften von CD2-AK und CD34-AK gekoppelten Polystyrolnanopartikeln

Die Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften von CD2-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln, die mit Styrol-PEG-Succinimidyl-Carbonat abgeunden wurden (SPSC-CD2 (n=3)) ergab die in Abbildung 15 graphisch dargestellten Werte nach Inkubation mit Jurkat

Zellen (CD2+). Als Negativproben wurden mit CD34-AK gekoppelte Polystyrolnanopartikel (SPSC-CD34 (n=3)), zwei nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel SPSC-PBS und SPSC-Glycin (jeweils n=3) und PBS nach Inkubation mit Jurkat-Zellen verwendet.



**Abbildung 15:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen (Cluster of Differentiation 2+ (CD2+)) zum Nachweis der spezifischen Antigen-detektion in vitro. MW: Mittelwert. MLI: Mittlere Leuchtintensität.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD2-Antikörpern gekoppelte Polystyrolnanopartikel verwendet: SPSC-CD2 (Styrol Polyethylenglykol Succinimidyl Carbonat (SPSC)-Funktionalisierung, C=1,46%, D=167 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $5,7 \times 10^9$ ) verwendet.

Als Negativkontrolle wurden mit CD34-AK gekoppelte Polystyrolnanopartikel SPSC-CD34 (SPSC-Funktionalisierung, C=1,5%, D= 166 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $6,0 \times 10^9$ ), nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel SPSC-PBS (SPSC-PBS- Funktionalisierung, C=1,4%, D=168 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $5,4 \times 10^9$ ) und SPSC-Glycin (SPSC-Glycin- Funktionalisierung, C=1,4%, D=170 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $5,2 \times 10^9$ ) und Phosphat buffered saline (PBS) verwendet. PMI:Perylen monoimid.

Auch in dieser Versuchsreihe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten der CD2-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel SPSC-CD2 und den Negativkontrollen festgestellt werden.

### 3.4.1.3 Bindungseigenschaften von mit CD3-AK gekoppelten Polystyrolnanopartikeln

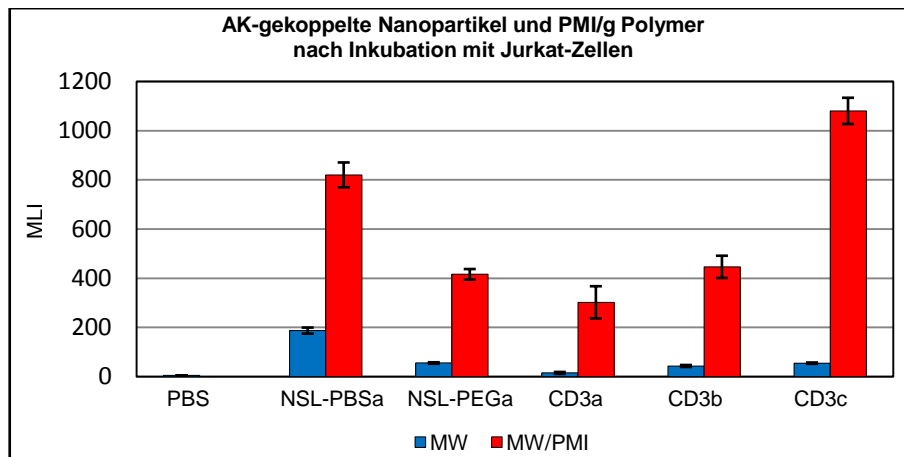
Nach Rücksprache mit dem Forschungsteam des Instituts für pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt um PD. Dr. Klaus Langer (Dinauer et al. 2005), welche bereits spezifische Bindungseigenschaften von anderen Nanopartikeln nach Inkubation mit Jurkat-Zellen nachweisen konnten, wurden weitere Versuchsreihen mit einem in Inkubationszeit, Waschvorgang und Temperatur des Schüttelinkubators differenter Versuchsaufbau (s.o.) gestartet. Zudem wurden die Polystyrolnanopartikel anstatt

---

mit CD2-AK mit CD3-AK gekoppelt und mit den Jurakat-Zellen (CD2+/CD3+) inkubiert.

Um eine minimale unspezifische Bindungstendenz der Polystyrolnanopartikel zu erzielen, wurden im folgenden Versuch ihre freien Aminogruppen mit NSL gekoppelt. Zum Nachweis der spezifischen Bindungseigenschaften der Polystyrolnanopartikel wurden diese mit CD3-AK gekoppelt (CD3a (n=3), CD3b (n=3), CD3c (n=3)) und mit den Jurakat-Zellen inkubiert. Als Negativkontrollen wurden nicht AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel mit PBS und PEG-Oberflächenfunktionalisierung (NSL-PBSa (n=3), NSL-PEGa (n=3)) und PBS nach Inkubation mit Jurakat-Zellen verwendet. Da der PMI-Wert jeder einzelnen Polystyrolnanopartikel-Charge abhängig von Herstellungsprozess unterschiedliche hoch ist, wurde der PMI-Wert der einzelnen Polystyrolpolymere bereits vor der Inkubation mit den Zielzellen gemessen. So wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der durchgeführten Versuchsreihen mathematisch entsprechend der zuvor gemessenen PMI-Werte korrigiert.

Die Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften und der individuellen Fluoreszenzstärke bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel ergab die in Abbildung 16 graphisch dargestellten Werte.



**Abbildung 16:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of differentiation 3 (CD3)- Antikörpern (AK) gekoppelten Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen (CD3+) zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel verwendet: CD3a (Amino-Styrol-Lutensol-Funktionalisierung, C=1,2%, D=275 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,1 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,09 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und CD3b (Amino-Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol (PEG)- Funktionalisierung, C=1,45%, D=275 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $0,8 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,05 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und CD3c (Amino-Styrol-Lutensol- Funktionalisierung, C=0,95%, D=336 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $0,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,09 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

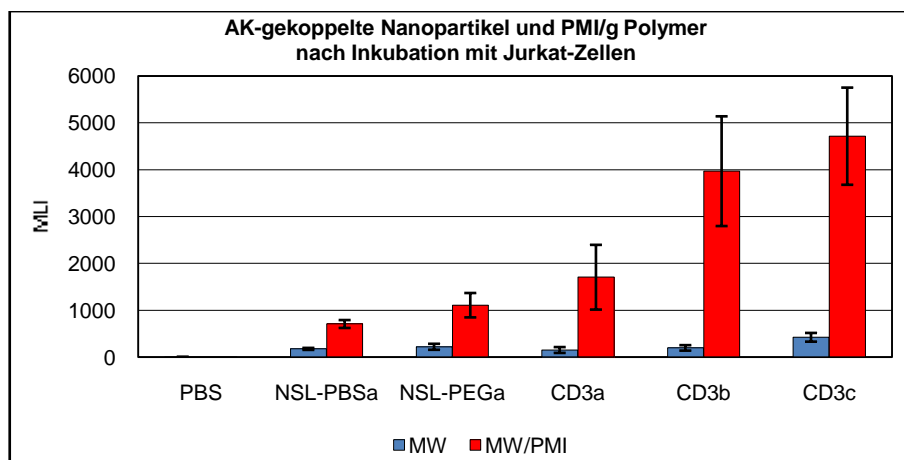
Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel NSL-PBSa (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline (PBS)- Funktionalisierung, C=1,45%, D=259 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,22 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGa (Amino-Styrol-Lutensol-PEG- Funktionalisierung, C=1,35%, D=261 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,20 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.

Obwohl der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel im Vergleich zu den nicht-AK gekoppelten Negativkontrollen ähnlich war, konnte aufgrund der individuell differentiellen Fluoreszenzfarbstoffgehalts der Polystyrolnanopartikel eine tendenziell stärker spezifische Bindung der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel festgestellt werden. Diese spezifische Bindungsstärke wurde in wiederholenden „blind“ durchgeführten Versuchsreihen mit CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln nach Inkubation mit Jurkat-Zellen (CD3+) verifiziert.

#### 3.4.1.4 Bindungseigenschaften von CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln

Die Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften und der individuellen Fluoreszenzstärke bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel wurde im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsreihen in Form einer „blind“ durchgeführten Versuchsreihe durchgeführt. Erst nach Auswertung der Versuchsreihen (n=3)

wurde den nummerierten Proben jeweiliges eine Polystyrolnanopartikelprobe zugeordnet. Die Auswertung ergab die in Abbildung 17 graphisch dargestellten Werte. Da der PMI-Wert jedes einzelnen Polystyrolnanopartikels abhängig von Herstellungsprozess unterschiedlich hoch ist, wurde der PMI-Wert der einzelnen Polystyrolnanopartikel bereits vor der Inkubation mit den Zielzellen gemessen. So wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der durchgeführten Versuchsreihen mathematisch entsprechend der zuvor gemessenen PMI-Werte korrigiert.



**Abbildung 17:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of Differentiation 3 (CD)- Antikörpern(AK)- gekoppelten Polystyrolnanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung, Feststoffgehalt (C), Durchmesser (D) und Teilchenanzahl nach Inkubation mit Jurkat-Zellen zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel verwendet: CD3a (Amino-Styrol-Lutensol-Funktionalisierung, C=1,2%, D=275 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,1 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,09 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und CD3b (Amino-Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol(PEG)- Funktionalisierung, C=1,45%, D=275 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $0,8 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,05 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und CD3c (Amino-Styrol-Lutensol- Funktionalisierung, C=0,95%, D=336 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $0,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,09 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel NSL-PBSa (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline (PBS)- Funktionalisierung, C=1,45%, D=259 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,22 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGa (Amino-Styrol-Lutensol-PEG- Funktionalisierung, C=1,35%, D=261 nm, Teilchenmenge pro 1  $\mu$ l Probe  $1,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,20 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.

Auch in dieser „blind“ durchgeführten Versuchsreihe war der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel im Vergleich zu den nicht-AK gekoppelten Negativkontrollen ähnlich. Dennoch konnte aufgrund des individuell differenten Fluoreszenzfarbstoffgehalts der einzelnen Polystyrolnanopartikel-Proben eine signifikant stärkere spezifische Bindung der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel an die CD3-positiven Jurkat-Zellen im Gegensatz zu den nicht-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln festgestellt werden.



---

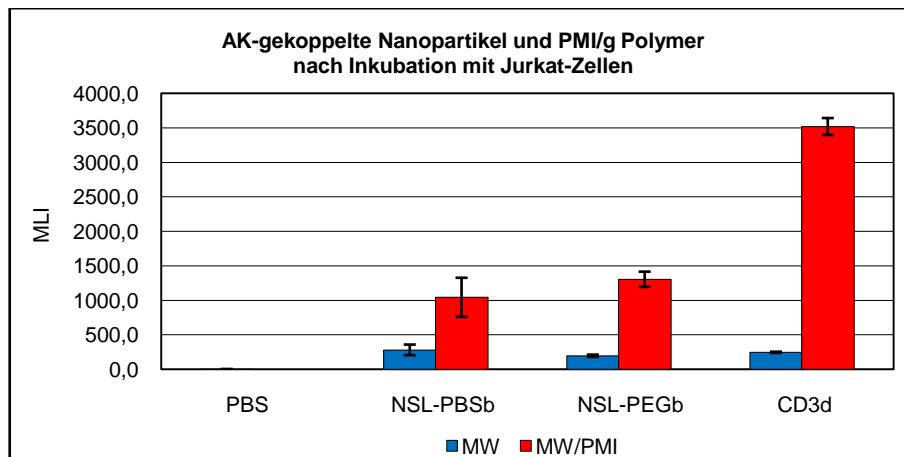
Es erfolgte nun die Durchführung einer weiteren Versuchsreihe mit AK-gekoppelten Polystyrolpolymeren zum Nachweis der spezifischen Bindung an Jurkat-Zellen. Zum Nachweis einer generellen Möglichkeit der spezifischen Antigen-detektion durch AK-gekoppelte Polystyrolpolymere wurde mit den Mutz-2 Zellen (CD34+) zusätzlich ein alternatives Antigen-Antikörper-System mit in die Versuchsreihen einbezogen.

#### **3.4.1.5 Bindungseigenschaften von CD3- und CD34-AK-gekoppelten**

##### **Polystyrolnanopartikeln**

In den vorliegenden Versuchsreihen wurden die freien Aminogruppen der Polystyrolnanopartikel mit Amino-Styrol-Lutensol (NSL) abgebunden, um ihre unspezifische Bindungstendenz zu minimieren. Zusätzlich wurden die Polystyrolnanopartikel mit CD3-AK (CD3d (n=3)) und CD34-AK (CD34a (n=3)) gekoppelt. Nach Inkubation mit den antigenpräsentierenden Jurkat-Zellen (CD3+) sowie Mutz-2-Zellen (CD34+), wurden ihre spezifischen Bindungseigenschaften bestimmt. Als Negativkontrollen dienten nicht AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel mit PBS und PEG-Oberflächenfunktionalisierung (NSL-PBSb (n=3), NSL-PEGb (n=3)) und PBS.

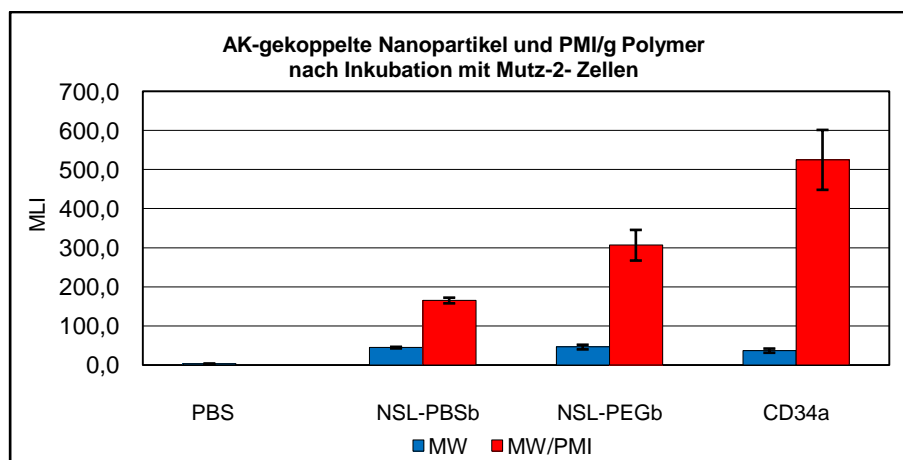
Die Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften und der individuellen Fluoreszenzstärke bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel ergab die in Abbildung 18 und 19 graphisch dargestellten Werte. Da der PMI-Wert jedes einzelnen Polystyrolnanopartikels abhängig von Herstellungsprozess unterschiedlich hoch ist, wurde der PMI-Wert der einzelnen Polystyrolnanopartikel bereits vor der Inkubation mit den Zielzellen gemessen. So wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der durchgeführten Versuchsreihen mathematisch entsprechend der zuvor gemessenen PMI-Werte korrigiert.



**Abbildung 18:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of Differentiation 3 (CD3)- Antikörpern(AK)- gekoppelten Polystyrolnanopartikeln zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD3-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel verwendet: CD3d (Amino-Styrol-Lutensol-Funktionalisierung, C=1,5%, D=269 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $1,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,07 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel: NSL-PBSb (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline(PBS)- Funktionalisierung, C=1,7%, D=241 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $12,2 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,27 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGb (Amino-Styrol-Lutensol-Polystyrol-ethylen glykol(PEG)-Funktionalisierung, C=1,5%, D=250 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $1,8 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,15 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.



**Abbildung 19:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of differentiation 34 (CD34)- Antikörpern(AK)- gekoppelten Polystyrolnanopartikeln zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD34-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel verwendet: CD34a (Amino-Styrol-Lutensol-Funktionalisierung, C=1,3%, D=244 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $1,6 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,09 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

Als Negativkontrolle wurden nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel: NSL-PBSb (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline (PBS)-Funktionalisierung, C=1,7%, D=241 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $12,2 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,27 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGb (Amino-Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol(PEG)-Funktionalisierung, C=1,5%, D=250 nm, Teilchenanzahl pro 1  $\mu$ l Probe  $1,8 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,15 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.

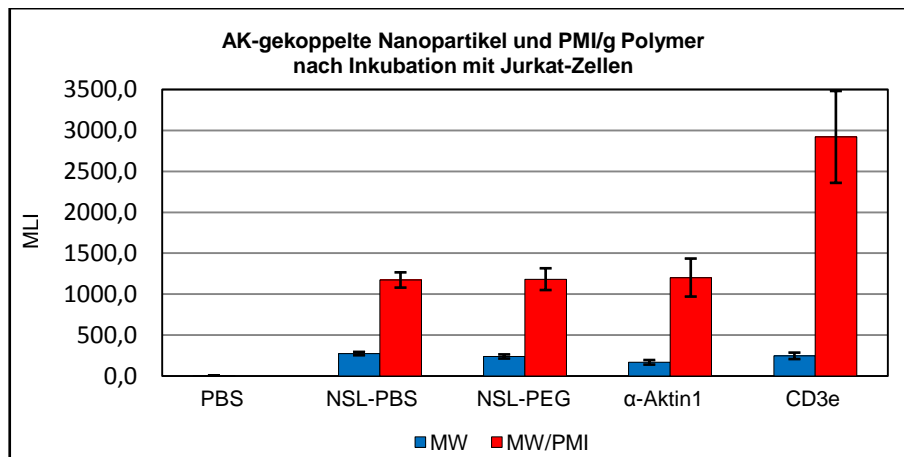
Es ist zu erkennen, dass eine spezifische Antigen-Antikörperbindung, sowohl zwischen CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln und den CD3-positiven

---

Jurkat- Zellen, als auch zwischen CD34-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln und CD34-positiven Mutz-2-Zellen stattgefunden hat. Um dieses Ergebnis visualisieren zu können, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt, in deren Anschluss elektronenmikroskopische und laserscannmikroskopische Bilder zur Lokalisation der spezifischen Antigen-detektion auf den Zellen angefertigt wurden. Hier wurde  $\alpha$ -Aktin als zusätzliche IgG-„gematchte“ Negativkontrolle verwendet.

#### **3.4.1.6 Bindungseigenschaften von CD3-AK, CD34-AK und $\alpha$ -Aktin gekoppelten Polystyrolnanopartikeln**

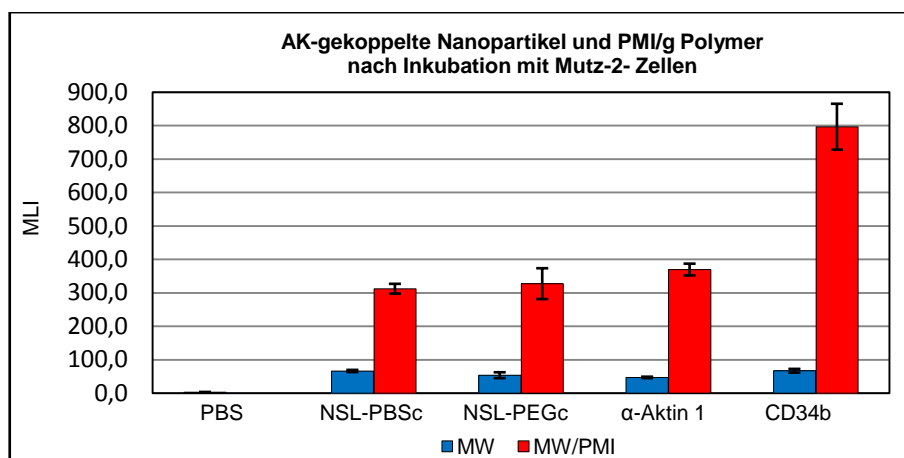
Wie in den vorherigen Versuchsreihen wurden die verwendeten Polystyrolnanopartikel mit NSL gekoppelt, um die unspezifischen Bindungseigenschaften der freien Aminogruppen auf ihrer Oberfläche zu minimieren. Zum Nachweis der spezifischen Bindungseigenschaften wurden die Nanopartikel mit CD3-AK gekoppelt und mit Jurkat-Zellen (CD3+) inkubiert sowie mit CD34-AK gekoppelt und mit Mutz-2-Zellen (CD34+) inkubiert. Als Negativkontrollen wurden nicht AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel mit PBS- und PEG-Funktionalisierung (NSL-PBS<sub>c</sub> (n=3), NSL-PEG<sub>c</sub> (n=3)) und PBS verwendet. Zudem wurden mit  $\alpha$ -Aktin-gekoppelte Polystyrolnanopartikel ( $\alpha$ -Aktin1 (n=3)) als Negativkontrolle verwendet.  $\alpha$ -Aktin ist ein Strukturprotein von glatten Muskelzellen. Es dient zur Charakterisierung und wird weder von den Jurkat-Zellen noch von den Mutz-2-Zellen expremiert. Deshalb kann  $\alpha$ -Aktin als Negativkontrolle für IgG gekoppelte Antikörper verwendet werden. Abbildung 20 und 21 zeigen graphisch die nach Auswertung der durchflusszytometrisch bestimmten spezifischen Bindungseigenschaften und der individuellen Fluoreszenzstärke bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Da der PMI-Wert jedes einzelnen Polystyrolnanopartikels abhängig von Herstellungsprozess unterschiedliche hoch ist, wurde der PMI-Wert der einzelnen Polystyrolpolymere bereits vor der Inkubation mit den Zielzellen gemessen. So wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der durchgeführten Versuchsreihen mathematisch entsprechen der zuvor gemessenen PMI-Werte korrigiert.



**Abbildung 20:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of differentiation 3 (CD3)- Antikörpern(AK)- gekoppelten Polystyrolnanopartikeln zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurden folgende mit CD3-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel verwendet: CD3e (Amino-Styrol-Lutensol-Funktionalisierung, C=0,8%, D=204 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $1,7 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,07 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

Als Negativkontrolle wurde eine mit α-Aktin gekoppelte Polystyrolnanopartikel-Probe: α-Aktin1 (Amino-Styrol-Lutensol- Funktionalisierung, C=0,6%, D=193 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $1,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,12 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ), nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel NSL-PBSc (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline (PBS)- Funktionalisierung, C=1%, D=197 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $2,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,22 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGc (Amino-Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol(PEG)-Funktionalisierung, C=1%, D=193 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $12,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $2,55 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.



**Abbildung 21:** Fluoreszenzintensitäten (n=3) mit Standardabweichungen von Cluster of differentiation 34 (CD34)- Antikörpern(AK)- gekoppelten Polystyrolnanopartikeln zum Nachweis der spezifischen Antigendetektion in vitro. MLI: Mittlere Leuchtintensität. MW: Mittelwert. PMI: Perylen monoimid.

In den Versuchsreihen wurde folgender mit CD34-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel verwendet: CD34b (Amino-Styrol-Lutensol- Funktionalisierung, C=0,9%, D=189 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $2,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,08 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) verwendet.

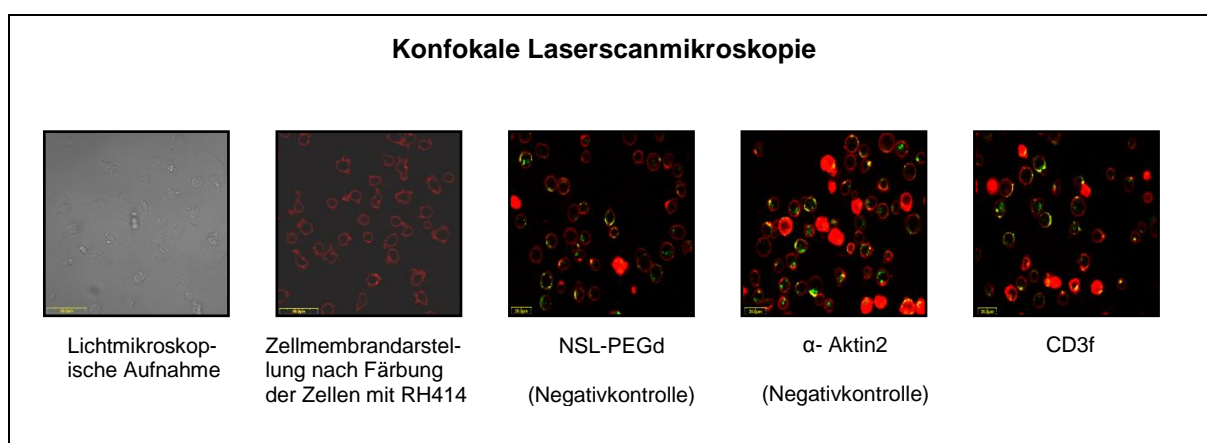
Als Negativkontrolle wurde eine mit α-Aktin gekoppelte Polystyrolnanopartikel-Probe: α-Aktin1 (Amino-Styrol-Lutensol- Funktionalisierung, C=0,6%, D=193 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $1,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,12 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ), nicht-AK-gekoppelte Polystyrolnanopartikel NSL-PBSc (Amino-Styrol-Lutensol-Phosphat buffered saline (PBS)- Funktionalisierung, C=1%, D=197 nm, Teilchenanzahl pro 1 µl Probe  $2,4 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $0,22 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und NSL-PEGc (Amino-Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol- Funktionalisierung, C=1%, D=193 nm, Teilchenmenge pro 1 µl Probe  $12,5 \times 10^9$ , PMI-Gehalt  $2,55 \text{ mg}_{\text{PMI}}/\text{g}_{\text{Polymer}}$ ) und PBS verwendet. Der blaue Balken beschreibt die Mittelwerte, der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Polystyrolnanopartikel und der rote Balken steht für den Fluoreszenzfarbstoffgehalt pro Gramm Polystyrolpartikel. Der rote Balken ist das Maß für die individuelle Fluoreszenzstärke.

### 3.5 IV: Bildlicher Nachweis der Nanopartikel-Antigen-Kopplung auf den Zielzellen

Zur Darstellung der Nanopartikel-Antigen-Kopplung und somit zum Nachweis der spezifischen Zielzellendetektion von AK-gekoppelten Polymeren wurden Bilder der Jurkat-Zellen nach Inkubation mit den CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln (CD3f) angefertigt. Als Negativkontrollen dienten mit  $\alpha$ -Aktin-gekoppelte Polystyrolnanopartikel ( $\alpha$ -Aktin2) und nicht AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel mit PEG-Funktionalisierung (NSL-PEGd). Nach im Kapitel Methoden beschriebener Versuchsvorbereitung wurden Bilder mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (siehe Abbildung 22), einem TEM (siehe Abbildung 23) und einem REM (siehe Abbildung 24) angefertigt.

#### 3.5.1 Detektion der antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikel mit dem konfokalen Laserscanmikroskop

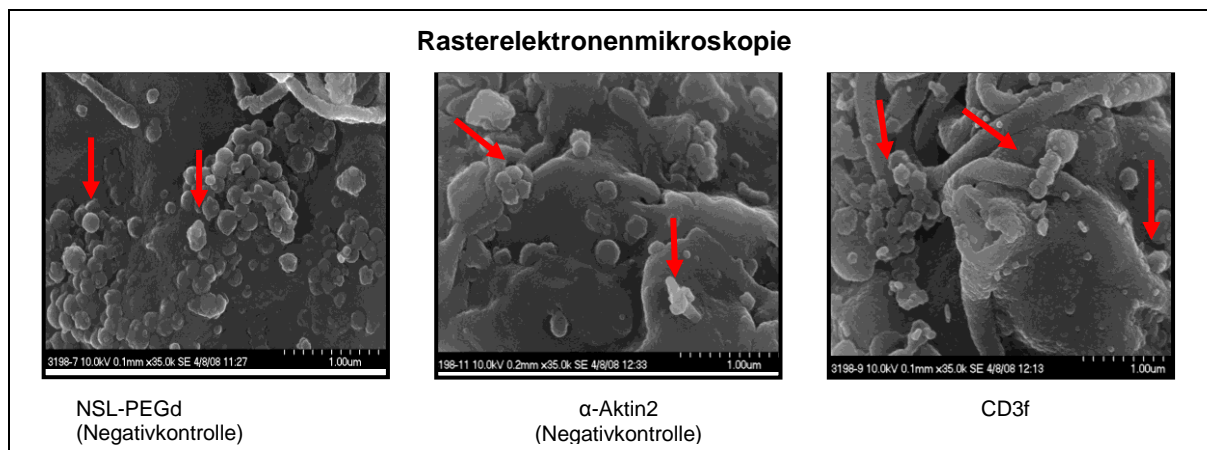
Die zur Lokalisation der Polystyrolpolymere aufgenommenen Bilder mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (Abb.22) zeigen, dass NSL-PEGd und  $\alpha$ -Aktin2 als Negativkontrollen, sowohl auf der Oberfläche der Zielzellen unspezifisch binden, als auch in die Zielzellen aufgenommen werden. Die mit CD3-AK gekoppelten Polystyrolnanopartikel CD3f werden in gleicher Weise auf der Zielzelloberfläche gebunden und in die Zellen aufgenommen.



**Abbildung 22:** Aufnahmen der Jurkat-Zellen mit einem konfokalen Laserscanmikroskop nach oben beschriebener Versuchsvorbereitung und Inkubation mit den verschiedenen Polystyrolnanopartikeln. CD3f, eine mit Cluster of Differentiation 3 (CD3)- Antikörpern(AK)- gekoppelte Polystyrolnanopartikel-Probe wurde verwendet und  $\alpha$ -Aktin2 und NSL-PEGd (Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol-Funktionalisierung) dienen als Negativkontrollen. (Urheberin der Bilder: Dr. rer. nat. Myriam Lorenz)

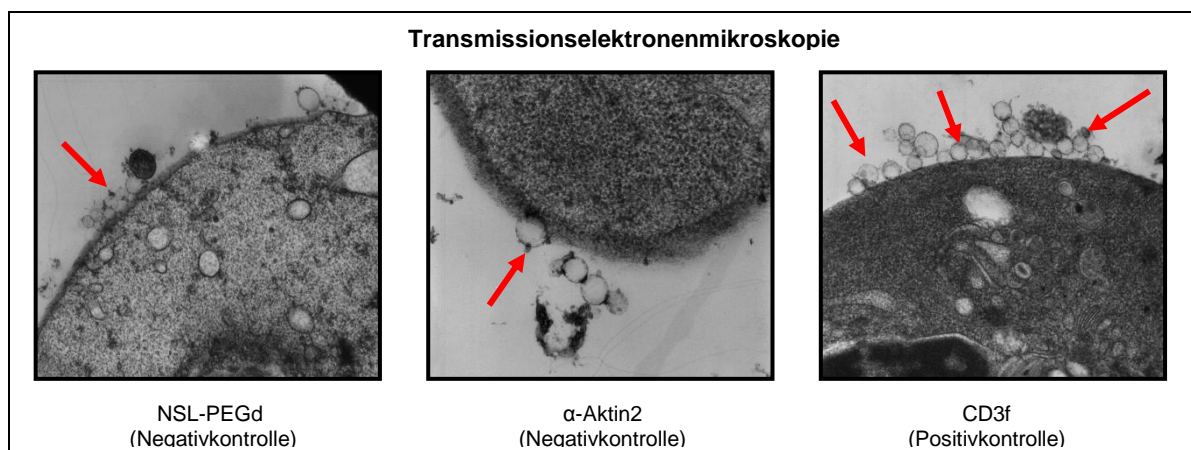
### 3.5.2 Detektion der antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikel mit dem Rasterelektronenmikroskop

Die zur Lokalisation der Polystyrolnanopartikel aufgenommenen Bilder mit dem Rasterelektronenmikroskop (Abb.23) zeigen, dass NSL-PEGd und  $\alpha$ -Aktin2 als Negativkontrollen sowie auch CD3f als Positivkontrolle auf der Oberfläche der Zielzellen binden.



**Abbildung 23:** Aufnahmen der Jurkat-Zellen mit einem Rasterelektronenmikroskop nach oben beschriebener Versuchsvorbereitung und Inkubation mit den verschiedenen Polystyrolnanopartikeln. Es wurde CD3f, eine mit Cluster of differentiation 3 (CD3)- Antikörpern (AK)- gekoppelte Polystyrolnanopartikel-Probe verwendet, sowie als Negativkontrolle  $\alpha$ -Aktin2 und NSL-PEGd (Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol-Funktionalisierung). Die roten Pfeile zeigen eine mögliche Antigen-Antikörperbindung auf den Zelloberflächen (Urheber der Bilder: Martin Dass).

### 3.5.3 Detektion der antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop



**Abbildung 24:** Aufnahmen der Jurkat-Zellen mit einem Transmissionselektronenmikroskop nach oben beschriebener Versuchsvorbereitung und Inkubation mit den verschiedenen Polystyrolnanopartikeln. CD3f, eine mit Cluster of differentiation 3 (CD3)- Antikörpern (AK)- gekoppelte Polystyrolnanopartikel-Probe wurde verwendet und  $\alpha$ -Aktin2 und NSL-PEGd (Styrol-Lutensol-Polyethylenglykol-Funktionalisierung) dienen als Negativkontrollen. Die roten Pfeile zeigen eine mögliche Antigen-Antikörperbindung auf den Zelloberflächen (Urheber der Bilder: Martin Dass).

Die zur Lokalisation der Polystyrolnanopartikel aufgenommenen Bilder mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 24) zeigen, dass NSL-PEGd und  $\alpha$ -

---

Aktin2 als Negativkontrollen sowie auch die mit CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel CD3f auf der Oberfläche der Zielzellen vorkommen.

Sowohl auf den Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop als auch auf den elektronenmikroskopisch angefertigten Aufnahmen der Jurkat-Zellen nach Inkubation mit den Polystyrolnanopartikeln konnte im direkten Vergleich zwischen den AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln und den Negativkontrollen kein klarer Unterschied in den Bindungseigenschaften auf den zu detektierenden Zielzellen dargestellt werden. In den Aufnahmen, welche nach Inkubation der Jurkat-Zellen mit den AK-gekoppelten Nanopartikel angefertigt wurden, konnten zwar AK-gekoppelte Nanopartikel auf den Zielzellen gezeigt werden, aber in den Aufnahmen der Negativkontrollproben wurden ebenfalls Polystyrolnanopartikel auf den Zielzellen identifiziert. Diese stellten sich in ähnlicher Weise wie in den Proben mit den AK-gekoppelten Nanopartikeln die möglichen Antigen-Antikörper-Bindungen dar (siehe rote Pfeile). Hierbei muss man beachten, dass auf den angefertigten Bildern immer nur kleine Ausschnitte oder einzelne Zellen abgebildet werden und nicht grundsätzlich von einer gleichen Verteilung der Polystyrolnanopartikel auf den gesamten Zellen ausgegangen werden kann, so dass es sich bei den Ergebnissen zur Lokalisation der spezifischen Zelldetektion um ein subjektiv erzielt Ergebnis handelt. Ergänzend dazu steht die Methode der FACS-Analyse. Durchflusszytometrisch ist es möglich eine hohe Anzahl von Zellen objektiv zu charakterisieren und die erhaltenen Ergebnisse statistisch auszuwerten.

Insgesamt konnte somit durchflusszytometrisch ein Hinweis für die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung zwischen den CD3-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln und den Jurkat-Zellen und den CD34-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln und den Mutz-2-Zellen in vitro erbracht werden. Es scheint, dass mit Aminogruppen funktionalisierte, fluoreszierende und antikörpergekoppelte Polystyrolnanopartikel demzufolge in vitro in der Lage sind, spezifisch Zielzellen zu detektieren.

---

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, die zeigt, dass antikörpergekoppelte Polystyrolnanopartikel in vitro prinzipiell in der Lage sind, zelluläre Oberflächenantigene spezifisch zu detektieren.

Dazu wurden Polystyrolnanopartikel mit einem fluoreszierenden Farbstoff (PMI) beladen, auf ihrer Oberfläche mit Aminogruppen funktionalisiert und zur Minimierung von unspezifischen Bindungsreaktionen, sowie zur Stabilitätsunterstützung mit Polyethylenglykol-Ketten auf ihrer Oberfläche abgebunden. Nach durchflusszytometrischer Detektion des Polystyrolnanopartikels mit der geringsten Eigenfluoreszenzintensität wurde dieser mit CD3- und CD34-AK gekoppelt. Es folgten durchflusszytometrische Bestimmungen der PMI-positiven Zellen nach spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion. Zur visuellen Darstellung der Lokalisation der Polystyrolnanopartikel an den spezifischen Zielzellen wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscanmikroskop, einem Rasterelektronenmikroskop und einem Transmissionselektronenmikroskop angefertigt.

Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, Polystyrolnanopartikel stabil mit Antikörpern zu koppeln. Dabei wurden die Partikel mit dem Verfahren der Miniemulsion-Polymerisation (Landfester 2006) in variabler Größe hergestellt, ihre Oberflächenbeschaffenheiten und –morphologie konnte gezielt verändert und eine stabile Antikörperkopplung erreicht werden. Zur AK-Kopplung der Polystyrolnanopartikel wurden optimal funktionalisierte Polystyrolnanopartikel, welche eine minimale unspezifische Bindungstendenz besitzen, gefunden. Letztendlich sollte gezeigt werden, dass eine spezifische Antigendetektion durch ein auf aminofunktionalisierten, fluoreszierenden Polystyrolnanopartikeln basierendes Kontrastmittel prinzipiell möglich ist. Dazu wurden IgG-AK an die funktionalisierten Oberflächen der Polystyrolnanopartikel gekoppelt, welche spezifisch die antigenpräsentierenden Zellen detektieren. Die antigentragenden Zielzellen wurden mittels FACS-Analyse, konfokaler Laserscanmikroskopie und Elektronenmikroskopie identifiziert.

Eine spezifische Antigendetektion durch AK-gekoppelte Polystyrolpolymere konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die durch die Elektronenmikroskopie und die konfokale Laserscanmikroskopie angefertigten



---

Bilder der AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikel nach Inkubation mit den Zielzellen zeigten eine Lokalisation der Polystyrolnanopartikel auf den Zielzellen, die sich aber nicht eindeutig von den Negativkontrollproben mit nicht-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln abgrenzen lässt.

#### **4.1 Nanopartikel als spezifische Trägerelemente in der Medizin**

Nanopartikel sind feste kolloidale Partikel im Größenbereich von 1 bis 1000nm, welche aus verschiedenen Makromolekülen zusammengesetzt sein können. In die Nanopartikel können Wirkstoffe eingeschlossen, verkapselt, gelöst oder an ihrer Oberfläche adsorbiert oder kovalent gebunden werden (Kreuter 1983, Lockman et al. 2002). Die verschiedenen Ausgangsmaterialien und Herstellungsmethoden erlauben mit ihrer Vielzahl an produzierenden Eigenschaften für die Nanopartikel einen breitgestreuten Einsatz. Die meisten Trägersysteme bieten neben dem alleinigen Wirkstofftransport die Möglichkeit eines „Drug-Targeting“, welches über eine Bindung von Liganden an die Nanopartikeloberfläche erreicht werden kann. Als Targeting-Struktur eignen sich Antikörper oder andere Rezeptor-Bindungsliganden, die einen zielgerichteten Transport und eine nachfolgende spezifische zelluläre Aufnahme ermöglichen. Solche modifizierten Nanopartikel könnten als Wirkstofftransportsystem im menschlichen Körper eingesetzt werden (Nobs et al.2006).

Die Verwendung von Nanopartikeln als spezifische kolloidale Trägerelemente in der Medizin stand bereits in vielen Studien im Blickpunkt der medizinischen Forschung (Vijayanathan et al. 2002, Kreuter 2001). Wichtig für die Auswahl eines geeigneten Materials zur Nanopartikelherstellung mit dem Ziel der medizinischen Anwendung in vivo ist die Möglichkeit des Abbaus der verwendeten Substanzen durch körpereigene, zelluläre Enzyme beispielsweise zur Freisetzung eines Wirkstoffes, eine geeignete Stabilität der Nanopartikel, die eine Lagerung und das Vordringen zu den Zielzellen ermöglicht und eine möglichst geringe Toxizität.

In der vorliegenden Arbeit wurden Nanopartikel aus Styrolpolymeren im Miniemulsionsverfahren (Landfester 2006) hergestellt. Polystyrol ist ein kostengünstiges Material, welches chemisch stabil und reaktionsträge ist. Durch das spezifische Herstellungsverfahren ist eine Anpassung der Oberflächenbeschaffenheiten und -bestandteile (hier durch Funktionalisierung und Kopplung mit PEG oder Glycin) und eine variable Festlegung der

---

Nanopartikelgröße vor deren Synthese möglich, welche einfach reproduzierbar ist. Mit der durch Funktionalisierung veränderten Oberflächenbeschaffenheit der Polystyrolnanopartikel besteht die Möglichkeit, eine höhere Transportkapazität beispielsweise für fluoreszierenden Farbstoffe, wie PMI zu erreichen (Landfester 2006), als es bei alleiniger Kopplung von fluoreszierendem Farbstoff an Antikörper möglich wäre. Somit sind funktionalisierte Polystyrolnanopartikel nicht nur in der Lage, spezifische Zielgewebe und Zielzellen durch Antikörperkopplung zu detektieren, sondern diese auch visuell durch ihre Eigenfluoreszenzintensität sichtbar zu machen. Antikörper gehören zum Immunsystem und sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die als Reaktion auf Antigene gebildet werden. Aufgrund ihrer Fähigkeit der spezifischen Zielantigendetektion und ihrer zellulären Internalisierung haben sie sich etabliert als Wegweiser für Kontrastmittel, um die diagnostische Aussagekraft sowohl in der Magnetresonanz- als auch in der Computertomographie zu potenzieren. Viele Kontrastmittel haben allerdings einen erheblichen Nachteil: Sie verteilen sich gleichmäßig schnell in den Körperhöhlen, in die sie injiziert werden und verschwinden schnell wieder, beispielsweise über die Blutbahn. Liegen nun antikörpergekoppelte Nanopartikel im Kontrastmittel vor, würden diese nur an bestimmten Zielzellen binden und diese markieren. Notwendige Bedingungen zur Entwicklung eines solchen spezifischen und wirksamen Detektions- und Anbindungssystems über antikörpergekoppelte Nanopartikel sind eine Verbesserung ihrer Stabilität und eine genaue Erforschung ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften (Owens und Peppas 2006). Zur Minimierung von unspezifischen Bindungsreaktionen und Stabilisierung können Nanopartikel beispielsweise mit Polyethylenglykol (PEG) auf ihrer Oberfläche versehen werden und ihre Bindungseigenschaften und ihr Abbau durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) modifiziert werden (Brigger et al. 2002). PEG bildet eine Art protektive Schicht auf der Polymeroberfläche, welche die Polymere vor einer Detektion durch beispielsweise das mononukleäre Phagozytensystems (MPS) vor Erreichen ihrer Zielzellen bewahrt.

#### **4.1.1 Klinische Anwendungsfelder von Nanopartikeln**

Insgesamt wird bei der klinischen Anwendung von Nanopartikel zwischen dem Prozess des passiven und aktiven „Drug Targeting“ unterschieden. Der Prozess des passiven „Drug Targeting“, bei dem die in den Blutkreislauf eingebrachten

---

Nanopartikel schnell in den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) (Schäfer et al. 1994) angereichert werden, kann genutzt werden, um Arzneistoffe bei Erkrankungen, bei denen Monozyten und Makrophagen betroffen sind, zielgerichtet in die erkrankten Zellen zu transportieren. Hierzu zählen Protozoen Erkrankungen (Basu und Lala 2004) und virale Infektionen wie HIV-Infektionen (Schäfer et al. 1994). Bei aktivem „Drug Targeting“ wird im Gegensatz dazu versucht, den Arzneistoff gezielt an nichtzugängliche Körperkompartimenten anzureichern. Eine Aufnahme durch Zellen des MPS ist hierfür unerwünscht und wird versucht, durch beispielsweise das Einführen hydrophiler Barrieren wie PEG zu verhindern (van Vlerken et al. 2007). Auch durch ein „Coating“ der Nanopartikel mit beispielsweise Polysorbaten und Poloxameren (Tröster und Kreuter 1992) kann die Anreicherung von Nanopartikeln im MPS reduziert werden. Auf diese Art und Weise können die Nanopartikel über einen längeren Zeitraum im Blutkreislauf verweilen. So wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Kopplung der freien Aminogruppen der Polysyrolnanopartikel mit PEG eine unspezifische Bindungsneigung minimiert. Da im Bereich von soliden Tumoren das Gefäßendothel nicht mehr intakt ist, können die Nanopartikel hier die Blutbahn verlassen und sich im Gewebe anreichern. Dieses wird genutzt, um Arzneistoffe in Tumoren anzureichern (Maeda et al. 2000). Durch „Drug Targeting“-Liganden (Nobs et al. 2006) wie Antikörper oder verschiedene Apoproteine wird eine zellspezifische Anreicherung des Trägersystems und seines Wirkstoffs an die Zielzellen erreicht und der Prozess des passiven Drug Targeting optimiert. So wurden Albuminnanopartikel bereits mit thioliertem Trastuzumab, einem humanen monoklonalen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2, welcher sich auf der Zelloberfläche von u.a. Brustkrebszellen befindet, gekoppelt. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Trastuzumab gekoppelten Albuminnanopartikel spezifisch ihre Zielzellen (eine Zelllinie, die HER2-Rezeptoren überexprimiert) detektieren und durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Steinhauser et al. 2006, Spänkuch et al. 2008).

Die in dieser Arbeit verwendeten Polystyrolnanopartikel sollen als Modell für weitere Partikel im Bezug auf das aktive „Drug-Targeting“ verstanden werden. Es wird durch Kopplung von Antikörpern an die Nanopartikel eine spezifische Zelldetektion erreicht, und durch den inkorporierten fluoreszierenden Farbstoff

---

besteht die Möglichkeit, diese spezifische Detektion auch nachzuweisen. Ein molekulares Kontrastmittel auf der Basis von fluoreszierenden und antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln könnte in der späteren Anwendung beispielsweise bei der DCM, zielgerichtet entzündlich verändertes Herzmuskelgewebe detektieren. Die verwendeten Polystyrolnanopartikel haben den Vorteil, dass sie billig produziert werden können. Auch die Herstellung in beliebiger Größe, Oberflächenbeschaffenheit und –morphologie ist problemlos möglich (Landfester 2006). Kontrovers diskutiert wird in der Literatur eine unklare Biokompatibilität von Polystyrol, da Polystyrol im menschlichen Körper nicht abbaubar ist (Harashima et al. 1994, <http://www.osha.gov/SLTC/styrene/index.html>, 2007).

## **4.2 Nanopartikel als spezifische Zellmarker in der Medizin**

### **4.2.1 Polystyrolnanopartikelherstellung und Charakterisierung**

Die in dieser Arbeit verwendeten Polystyrolnanopartikel wurden mit dem Verfahren der freien radikalischen Copolymerisation in einem Miniemulsionssystem hergestellt (Holzapfel et al. 2005, Musyanovych et al. 2007). Dadurch konnten die mittlere angestrebte Größe der entstehenden Nanopartikel sowie die Oberflächenbeschaffenheit und –morphologie zielgerichtet kontrolliert werden (Landfester 2006). Auf ihrer Oberfläche konnten die Polystyrolnanopartikel im oben beschriebenen Syntheseverfahren mit Amino- und Carboxygruppen funktionalisiert werden, dadurch ist eine kovalente Bindung zwischen Biomolekülen und den hergestellten Nanopartikeln möglich. In der vorliegenden Arbeit dient Glutaraldehyd als „Linker“ (Musyanovych und Adler 2005), um eine Bindung zwischen den funktionellen Gruppen und der Aminogruppe des anzukoppelnden Antikörpers zu erzielen. Die Kopplung zwischen Aminen und Carboxylgruppen ist gut untersucht und wird seit langem in der Biomedizin angewandt (Gao et al. 2004).

Da Polystyrol, eingebracht in ein biologisches System, nur schwer detektierbar ist und zur Re-Identifizierung diverse Hilfsmittel und Zusatzstoffe notwendig wären (Wilkins 1964), wurde den verwendeten Polystyrolpartikeln zur zielgerichteten Detektion ein fluoreszierender Farbstoff (PMI) inkorporiert. Auf diese Weise wird den Polystyrolnanopartikeln durch Fluoreszenz ein Merkmal zur spezifischen

---

Detektion gegeben, wie es bereits eine wichtige Rolle in vielen biologischen Anwendungen, beispielsweise der Genlokalisierung oder der Zellmarkierung spielt (Bhalgat et al. 1998, Taylor et al. 2000, Dubertret et al. 2001). Mit dem Ziel, eine hohe fluoreszierende Wirksamkeit zu erreichen, die gerade für Zellversuche wichtig ist, wurde die Konzentration des inkorporierten PMI mit dem einem UV-Spektrometer genau bestimmt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungsreaktionen und Wechselwirkungen wurden zusätzlich auf der Oberfläche der Polystyrolnanopartikel Polyethylenglykolketten (PEG), die als hydrophile sterische Barriere fungieren, angebracht (van Vlerken et al. 2007).

Insgesamt zeigte sich, dass mit Aminogruppen funktionalisierte Polystyrolnanopartikel eine große Bindungskapazität für Antikörper auf ihrer Oberfläche aufweisen. Aus diesem Grund wurden aminofunktionalisierte Polystyrolnanopartikel für die weiteren Zelldetektionsversuche verwendet. Desweiteren scheint eine zu große Anzahl von PEG-Ketten auf der Oberfläche der Polystyrolnanopartikel, eine Bindung zwischen Aminogruppen auf der Polystyroloberfläche mit den Antikörpern zu behindern.

Die FACS-analytische Messung von Fluoreszenzintensitäten und Zelldetektionen ist eine etablierte und einfache Methode, die bereits in vielen Studien verwendet wurde (Holzapfel et al. 2005, Steinhauser et al. 2006, Wartlick et al. 2004), um speziell gefärbte Zellen zu detektieren. Mittels FACS-Analyse konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass antikörpergekoppelte Polystyrolpolymere im Vergleich zu den als Negativkontrollen verwendeten nicht-antikörpergekoppelten Polystyrolnanopartikeln und den mit Alpha-Aktin-AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln, spezifisch an Zielzellen binden. Mit dem Elektronenmikroskop und dem konfokalen Laserscanmikroskop, welche zur genauen Lokalisation der Nanopartikel durchgeführt wurden, konnten die AK-gekoppelten Nanopartikel genau wie die als Negativkontrolle verwendeten nicht-AK-gekoppelten Nanopartikel auf den Zielzelloberflächen detektiert werden. Da es sich um eine deskriptive Methode der Darstellung handelt und nur Teile oder Ausschnitte der Zellen aufgenommen wurden und nicht die Gesamtheit, ist es auf diese Weise nicht möglich, eine statistisch ausreichende Unterscheidung zwischen den einzelnen Nanopartikeln zu treffen. Es besteht die Möglichkeit, dass die unspezifischen Bindungsreaktionen an Zelloberflächen eventuell durch die auf den Polymeroberflächen befindlichen Aminogruppen katalysiert werden und durch

---

eine größere Anzahl von PEG-Ketten auf der Polymeroberfläche minimiert werden (Wattendorf und Merkle 2008) .

Es bleiben im Bezug auf die angefertigten Aufnahmen der Polystyrolnanopartikel eine Reihe von Fragen ungeklärt. Es gibt keine Richtlinien und Erfahrungen dazu, wieviel Antikörper auf der Polymeroberfläche bzw. in welcher Konzentration die PEG-Ketten auf der Oberfläche der Nanopartikel am Besten unspezifische Bindungsreaktionen minimieren, oder auch in welchen Zeitraum bzw. Rahmen eine maximale Bindungsreaktion detektiert werden sollte, um die besten Ergebnisse zu erzielen. So konnte das Phänomen einer zeitabhängigen Abnahme der spezifischen Bindung zwischen Nanopartikeln und Zielzellen im Rahmen einer 24 h Zeitkinetik nach Inkuabtion bereits gezeigt werden (Dinauer et al. 2005, Steinhauser et al. 2006, Balthasar et al. 2005). Demzufolge scheint eine sichere und spezifische Antigendetektion durch Nanopartikel in den ersten 24 h möglich zu sein. Nach diesem Zeitraum von 24 h nehmen unspezifische Aufnahmemechanismen und Endozytose zu, welche mit der spezifischen Zielzelldetektion und der Aufnahme in die Zielzellen konkurrieren.

Es sind demnach noch weitere Versuchsreihen mit Polystyrolnanopartikeln notwendig, um bisherige Studienerfolge weiter zu optimieren.

#### **4.2.2 Vorteile von Polystyrolnanopartikeln**

Das als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Partikel verwendete Styrol gehört zu den Arenen, den aromatischen Kohlenwasserstoffen und ist eine günstige und leicht zu erwerbende Chemikalie. Styrol ist gegenüber Säuren, Laugen und Alkohol chemisch beständig und verhält sich reaktionsträge. Dies wäre ein klarer Vorteil in der Anwendung von Polystyrolpolymeren, da die chemische Beständigkeit der Partikel gegenüber beispielsweise dem pH-Wert in der in vivo-Anwendung am Tiermodell entscheidend ist. Denn im entzündlichen Gewebe, wie es bei der DCM im Herzmuskelgewebe der Fall ist, kommt es häufig zu einer intrazellulären pH-Wertverschiebungen in den sauren Bereich, wobei hier pH-Werte bis 5,7 beschrieben werden (Andersson et al. 1999).

Mit der freien radikalischen Copolymerisation im Miniemulsionsystem (Musyanovych et al. 2007) hat sich ein Verfahren zu Herstellung von Polystyrolnanopartikeln etabliert, welches eine kontrollierte, zielgerichtete Synthese der Polystyrolnanopartikel erlaubt. Im Bezug auf die individuell

---

angestrebte Größe und die variablen Oberflächenbeschaffenheit der Polystyrolpartikel erweist sich diese Methode als förderlich, da die hergestellten Polystyrolpartikel genau auf die Erfordernisse, der für sie angedachten Zielgewebe oder Zielzellen angepasst werden können. Diese Methode der Polymersynthese wurde bereits in einigen Studien erfolgreich angewendet (Musyanovych et al. 2007, Musyanovych und Adler 2005, Holzapfel et al. 2005, Sánchez-Martín et al. 2008). Die Gelegenheit, die Größe der Polystyrolnanopartikel variabel zu bestimmen, ist ein weiterer Vorteil. So wurden in der vorliegenden Arbeit Polystyrolnanopartikel verwendet, die eine durchschnittliche Größe zwischen 144 nm und 328 nm hatten. Überschreiten Nanopartikel eine Größe von ca. 200 nm werden sie in vivo aufgrund immunologischer Opsonierung schneller vom MPS phagozytiert und abgebaut (Harashima et al. 1994). Sind die Nanopartikel kleiner als ca. 100 nm besteht die Möglichkeit, dass sie durch das Endothel der Lebersinusoiden in die Leber gelangen und dort akkumulieren. Durch die Möglichkeit der individuellen Größenmodifikation, wäre eine optimale Größenanpassung unter Vermeidung der größenabhängigen Komplikationen durchführbar.

Nach Inkubation der Polystyrolnanopartikel mit den zwei in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien konnte durchflusszytometrisch im direkten Vergleich zur Negativkontrollprobe kein zytotoxischer Effekt der Nanopartikel auf die Zellen festgestellt werden. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die Anwendung von Polystyrolnanopartikeln in einem in vivo Tiermodell.

#### **4.2.3 Nachteile von Polystyrolnanopartikeln**

Kontrovers wird in der aktuellen Literatur die Biokompatibilität von Nanopartikeln, speziell auch der Nanopartikeln aus nicht abbaubaren Material wie Polystyrol diskutiert (Harashima et al. 1994, <http://www.osha.gov/SLTC/styrene/index.html>, 2007). Ein Risiko kann auftreten, wenn die Nanopartikel im Gewebe verbleiben, nicht abgebaut und die körpereigenen Zellen geschädigt werden. Eine derartige Dauerablagerung von Nanopartikeln in Makrophagen kann zur Bildung von Granulomen führen. Durch den Einsatz bioabbaubarer Polymerpartikel könnte eine solche Akkumulation im Gewebe der Leber, Nieren oder Lungen umgangen werden. Eine weitere mögliche Ursache für die Toxizität von Nanopartikeln kann eine gesteigerte Oberflächenreaktivität sein. Als Mechanismus wird eine

---

gesteigerte Produktion freier Radikale durch Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche diskutiert (Warheit 2008). So wurden Veränderungen der Toxizität abhängig von der Größe der Nanopartikel beim Vergleich von Kupfer-Nanopartikel (24 nm) und Kupfer-Mikropartikeln (17  $\mu\text{m}$ ) beobachtet (Meng et al. 2007).

Des Weiteren wird eine direkte mutagene Wirkung von Nanopartikeln am Zellkern diskutiert, welche aber bis heute speziell für Polystyrolnanopartikel weder nachgewiesen, noch verworfen werden konnte und direkt abhängig von den zur Herstellung der Nanopartikel verwendeten Materialien, ihrer Größe und Reaktionsfreudigkeit ist (Durnev 2008). So konnte in der Anwendung von Silbernanopartikeln ein mutagener Effekt an humanen Brustzellen nachgewiesen werden (Ahamed et al. 2008). In der Anwendung von Silikonnanopartikeln hingegen konnte kein direkt mutagener und zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (Barnes et al. 2008), was wiederum für eine starke und direkte Abhängigkeit der Mutagenität von den zur Nanopartikelherstellung verwendeten Materialien spricht und im Bezug auf Polystyrolnanopartikel weitere Studien und Versuchsreihen erfordert.

Ein weiterer Nachteil, der sich in der Polystyrolpolymeranwendung in vivo zeigen könnte, ist die Tendenz der Polystyrolnanopartikel zur unspezifischen Bindung an nicht spezifische, zelluläre Strukturen und eine frühzeitige Detektion der Polystyrolnanopartikel durch das MPS (Schäfer et al. 1994), welches ein Ankommen an den spezifischen Zielzellen also eine spezifische Detektion verhindert. Um diese negativen Bindungs- und Detektionseigenschaften zu minimieren, wurden die Polystyrolnanopartikel in der vorliegenden Arbeit mit PEG-Ketten auf ihrer Oberfläche versehen, welche als hydrophile Protektionsschicht fungieren und eine frühzeitige Absorption durch Makrophagen verhindert sollen.



---

### 4.3 Ausblick

Die Nanotechnologie hat in den letzten Jahren einen enormen Aufschwung erlebt und es wurden viele Fortschritte und neue Erkenntnisse erzielt. Das Ineinandergreifen von Chemie, Biologie und Medizin hat über die Polymerwissenschaften ganz neue Aspekte erhalten. Dennoch steht die Nanotechnologie in der Medizin noch am Anfang ihrer Entwicklung. Die Vielfältigkeit der denkbaren Einsatzmöglichkeiten in den Bereichen des zielgerichteten Transports von Arzneistoffen, der neuen Therapieverfahren durch Nanostrukturen und der in vivo- und in vitro-Diagnostik, lässt auch in Zukunft auf einen weiteren anhaltenden Aufschwung der Nanotechnologie in der Medizin hoffen.

Bezogen auf die Anwendung von Polystyrolnanopartikeln in der medizinischen Diagnosestellung bei DCM zeigt die vorliegende Arbeit, dass in vitro prinzipiell eine spezifische Zelldetektion durch antikörpergekoppelte Polystyrolnanopartikel möglich ist. Ein Austausch der auf der Nanopartikeloberfläche gekoppelten Antikörper erlaubt eine generelle Detektion jeder gewünschten antigentragenden Zielzelle und eröffnet weitere Verwendungsoptionen von AK-gekoppelten Polystyrolnanopartikeln beispielweise als Mediatoren im Bereich des aktiven „Drug-Targetings“. Demgemäß könnten in vivo bezogen auf das Krankheitsbild der DCM im entzündlichen Herzmuskelgewebe beispielweise CD3-positive Lymphozyten detektiert werden und durch nicht invasive, bildgebende Verfahren die Diagnose DCM gestellt werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, müssen noch einige wichtige Fragen geklärt werden und weiterführende Versuche durchgeführt werden. So könnte nach genauer Testung der Zytotoxizität und Mutagenität von Polystyrolnanopartikel eine in vivo-Anwendung antikörpergekoppelter Polystyrolnanopartikel am Tier beispielweise an einem „Myokarditis-Maus-Modell“ zur spezifischen Antigendetektion am entzündlich veränderten Herzmuskelgewebe durchgeführt werden. Um die Biokompatibilität eines möglichen Kontrastmittels zu verbessern, besteht die Option, das schlecht abbaubare, synthetische Polystyrol durch natürliche Ausgangsmaterialien wie Albumin, Gelatine, Dextran oder Poly-L-Laktid, die bioabbaubar sind, zu ersetzen. Auch könnte der den Polystyrolnanopartikeln inkorporierte fluoreszierende Farbstoff PMI in weiterführenden Versuchen durch ferromagnetische Lanthanoide wie Gadolinium (Jagielski et al. 2007) oder Eisen

---

ersetzt werden. Diese werden bereits in der klinischen Diagnostik wie beispielsweise der Magnetresonanztomographie erfolgreich verwendet und könnten in den Polystyrolpolymeren ebenfalls als Merkmal zur spezifischen Detektion dienen. Herausforderungen bestehen zudem in der Minimierung der unspezifischen Bindungstendenzen mit zellulären Oberflächen, Oberflächenproteinen und Zellen des MPS.

Insgesamt ist die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur spezifischen Antigendetektion in vitro eine Grundlage, die als ein erster Schritt gewertet werden kann, mit dem Ziel in Zukunft die Generierung eines molekularen Kontrastmittels zur spezifischen Antigendetektion im Herzmuskelgewebe zu erreichen.

## 5 Zusammenfassung

Die Nanotechnologie gewinnt im Rahmen der Diagnostik und Therapie in der Medizin zunehmend an Bedeutung. Denkbar ist der Einsatz von Kontrastmitteln basierend auf Nanopartikeln zur spezifischen Zelldetektion im entzündlich veränderten Herzmuskel bei Dilatativer Kardiomyopathie.

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die zeigt, dass fluoreszierende, mit Aminogruppen funktionalisierte und mit ImmunglobulinG (IgG) Antikörpern gekoppelte Polystyrolnanopartikel *in vitro* prinzipiell in der Lage sind, zelluläre Oberflächenantigene spezifisch zu detektieren.

Zu diesem Zweck wurden bezogen auf funktionelle Gruppen, die sich auf der Polymeroberfläche befinden, chemisch variabel zusammengesetzte Polystyrolnanopartikel im Verfahren der freien radikalischen Copolymerisation im Miniemulsionssystem hergestellt. Den Polystyrolnanopartikeln wurde ein fluoreszierender Farbstoff inkorporiert, um sie mit dem Fluorescent activated cell sorting (FACS) Gerät zu detektieren und ihre Fluoreszenzintensitäten zu bestimmen. Durchflusszytometrisch wurden Polystyrolnanopartikel gefunden, welche eine geringe unspezifische Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese mit Aminogruppen auf der Oberfläche funktionalisierten Polystyrolnanopartikel wurden durch Glutaraldehyd als „Linker“ mit Cluster of differentiation 3 (CD3)- und Cluster of differentiation 34 (CD34)- Antikörpern (AK) gekoppelt und zur spezifischen Antigendetektion nach Inkubation mit CD3-positiven Jurkat-Zellen und CD34-positiven Mutz-2-Zellen verwendet.

Insgesamt konnte durch zielgerichtet kontrollierte Veränderung der Oberflächenladung und -morphologie und Größenordnung der Polystyrolnanopartikel eine stabile und erfolgreiche Bindung von IgG-Antikörpern an Polystyrolnanopartikel erreicht werden. Zudem zeigte sich im direkten durchflusszytometrisch durchgeführten Vergleich der mit CD3- und CD34-AK gekoppelten Polystyrolnanopartikeln mit den Negativkontrollproben, dass eine spezifische Antigendetektion durch aminofunktionalisierte fluoreszierende Polystyrolnanopartikel möglich ist.

Diese Versuchsergebnisse stellen eine Grundlage für künftige Forschungsreihen an der Generierung eines molekularen Kontrastmittels zur spezifischen Antigendetektion dar.

---

## 6 Literaturverzeichnis

[1] **Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y.** DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells.

*Toxicol Appl Pharmacol* 2008 233:404-410.

[2] **Akasaka Y, Ueda H, Takayama K, Machida Y, Nagai T.** Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies.

*Drug Des Deliv* 1988 3:85-97.

[3] **Allémann E, Gurny R, Doelker E.** Drug-loaded nanoparticles - Preparation, Methods and Drug Targeting Issues.

*Eur J Pharm Bioharm* 1999 39:173-191.

[4] **Andersson SE, Lexmüller K, Johansson A, Ekström GM.** Tissue and intracellular pH in normal periarticular soft tissue and during different phases of antigen induced arthritis in the rat.

*J Rheumatol* 1999 26:2018-2024.

[5] **Anhorn MG, Wagner S, Kreuter J, Langer K, von Briesen H.** Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles.

*Bioconjug Chem* 2008 19:2321-2331.

[6] **Balthasar S, Michaelis K, Dinauer N, von Briesen H, Kreuter J, Langer K.** Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes.

*Biomaterials* 2005 26:2723-2732.

---

[7] **Barnes CA, Elsaesser A, Arkusz J, Smok A, Palus J, Leśniak A, Salvati A, Hanrahan JP, Jong WH, Dziubałtowska E, Stepnik M, Rydzyński K, McKerr G, Lynch I, Dawson KA, Howard CV.** Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity.

*Nano Lett* 2008 8:3069-3074.

[8] **Barnhart JL, Harada M, Lyle LR, Saravis CA.** Immunologic reactions of human recipients to repeated exposures to Alunex microspheres.

*Invest Radiol* 1991 26:192-193.

[9] **Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P.** The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans.

*J Mol Cell Cardiol* 1995 27:291-305.

[10] **Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rübsamen-Waigmann H.** Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro.

*Antimicrob Agents Chemother* 1996 40:1467-1471.

[11] **Bertling WM, Gareis M, Paspaleeva V, Zimmer A, Kreuter J, Nürnberg E, Harrer P.** Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers.

*Biotechnol Appl Biochem* 1991 3:390-405.

[12] **Bhalgat MK, Haugland RP, Pollack JS, Swan S, Haugland RP.** Green- and red-fluorescent nanospheres for the detection of cell surface receptors by flow cytometry.

*J Immunol Methods* 1998 219:57-68.

[13] **Bourel D, Rolland A, Le Verge R, Genetet B.** A new immunoreagent for cell labeling. CD3 monoclonal antibody covalently coupled to fluorescent polymethacrylic nanoparticles.

*J Immunol Methods* 1988 106:161-167.

---

**[14] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P.** Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis.

*Adv Drug Deliv Rev* 2002 54:631-651.

**[15] Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ.** Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers.

*J Pharm Sci* 1996 85:530-536.

**[16] Chavany C, Le Doan T, Couvreur P, Puisieux F, Hélène C.** Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides.

*Pharm Res* 1992 9:441-449.

**[17] Choo SJ, Kim JJ, Kim SP, Lee JW, Wan RS, Park NH, Lee SK, Yoo DG, Lee JW, Song H, Chung CH, Kim KS, Song MG.** Heart transplantation. A retrospective analysis of the long-term results.

*Yonsei Med J* 2004 45:1173-1180.

**[18] Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R.** The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.

*Eur Heart J* 2007 28:3076-3093.

**[19] Coughlin SS, Pearle DL, Baughman KL, Wasserman A, Tefft MC.** Diabetes mellitus and risk of idiopathic dilated cardiomyopathy. The Washington, DC Dilated Cardiomyopathy Study.

*Ann Epidemiol* 1994 4:67-74.

- 
- [20] **Coughlin SS, Szklo M, Baughman K, Pearson TA.** The epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in a biracial community.  
*Am J Epidemiol* 1990 131:48-56.
- [21] **Coughlin SS, Tefft MC, Rice JC, Gerone JL, Baughman KL.** Epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in the elderly: pooled results from two case-control studies.  
*Am J Epidemiol* 1996 143:881-888.
- [22] **Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE.** The epidemiology of heart failure.  
*Eur Heart J* 1997 18:208-225.
- [23] **Dec GW, Fuster V.** Idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*N Engl J Med* 1994 331:1564-1575.
- [24] **Dec GW, Jr Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA.** Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome.  
*N Engl J Med* 1985 312:885-890.
- [25] **Dinauer N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K, von Briesen H.** Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes.  
*Biomaterials* 2005 26:5898-5906.
- [26] **Dubertret B, Calame M, Libchaber AJ.** Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides.  
*Nat Biotechnol* 2001 19:365-370.
- [27] **Durnev AD.** Toxicology of nanoparticles.  
*Bull Exp Biol Med* 2008 145:72-74.

---

[28] **Fatkin D, Graham RM.** Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002 82:945-980.

[29] **Ferrans VJ.** Pathologic Anatomy of the dilated cardiomyopathies. *Am J Cardiol* 1989 64:9C-11C.

[30] **Figulla HR, Kellermann AB, Stille-Siegener M, Heim A, Kreuzer H.** Significance of coronary angiography, left heart catheterization, and endomyocardial biopsy for the diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1992 124:1251-1257.

[31] **Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S.** In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004 22:969-976.

[32] **Gaspar R, Opperdoes FR, Pr at V, Roland M.** Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol* 1992 86:41-49.

[33] **Gillum RF.** Idiopathic cardiomyopathy in the United States, 1970-1982. *Am Heart J* 1986 111:752-755.

[34] **Groetzner J, Reichart B, Roemer U, Reichel S, Kozlik-Feldmann R, Tiete A, Sachweh J, Netz H, Daebritz S.** Cardiac transplantation in pediatric patients: fifteen-year experience of a single center. *Ann Thorac Surg* 2005 79:53-60.

[35] **Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H.** Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res* 1994 11:402-406.



- 
- [36] **Heintzen MP, Schumacher T, Rath J, Ganschow U, Schoebel FC, Grabitz K, Vester EG, Leschke M, Köhler M, Strauer BE.** Incidence and therapy of peripheral arterial vascular complications after heart catheter examinations. *Kardiol* 1997 86:264-272.
- [37] **Holzapfel V, Musyanovych A, Landfester K, Lorenz M R, Mailänder V.** Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells. *Macromol Chem Phys* 2005 206:2440-2449.
- [38] **Hoppe U C.** Leitliniengerechte Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Der Internist* 2007 9:929-937
- [39] **<http://www.osha.gov/SLTC/styrene/index.html>** Administration.Styrene., Occupational Safty and Health 2007. Download-Datum: 26.08.2009.
- [40] **Jagielski N, Sharma S, Hombach V, Mailänder V, Rasche V, Landfester K.** Nanocapsules synthesized by miniemulsionstechnique for application as new contrast agent materials . *Makromol Chem Phys* 2007 208:2229-2241
- [41] **Keeling PJ, Gang Y, Smith G, Seo H, Bent SE, Murday V, Caforio AL, McKenna WJ.** Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. *Br Heart J* 1995 73:417-521.
- [42] **Klein J, Borck A.** Polymere: Vielseitige Materialien in der Medizin. *Carolo-Wilhelmina* 2002 1:90-95.
- [43] **Kreuter J.** Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. II: Comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions. *Pharm Acta Helv* 1983b 58:217-226.

---

[44] **Kreuter J.** Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use.

*Pharm Acta Helv* 1983a 58:242-250.

[45] **Kreuter J.** Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs.

*Adv Drug Deliv Rev* 2001 47:65-81.

[46] **Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP.** Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy.

*Heart* 1996 75:295-300.

[47] **Landfester K.** Synthesis of Colloidal Particels in Miniemulsions.

*Ann Rev Mater Res* 2006 36:231-279.

[48] **Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD.** Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier.

*Drug Dev Ind Pharm* 2002 28:1-13.

[49] **MacArthur CG, Tarin D, Goodwin JF, Hallidie-Smith KA.** The relationship of myocarditis to dilated cardiomyopathy.

*Eur Heart J* 1984 5:1023-1035.

[50] **Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K.** Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review.

*J Control Release* 2000 65:271-284.

[51] **Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB.** Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functio.

*Circulation* 2006 113:1807-1816.

---

**[52] Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P.** Nanoparticles-a new colloidal drug delivery system.

*Pharm Acta Helv* 1978 53:17-23.

**[53] Meng H, Chen Z, Xing G, Yuan H, Chen C, Zhao F, Zhang C, Zhao Y.** Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nano-copper particles.

*Toxicol Lett* 2007 175:102-110.

**[54] Michaelis K, Hoffmann MM, Dreis S, Herbert E, Alyautdin RN, Michaelis M, Kreuter J, Langer K.** Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain.

*J Pharmacol Exp Ther* 2006 317:1246-1253.

**[55] Musyanovych A:** Amino Functionalized Latex Particles Obtained in Presence of Surface-Active Initiators.

1 Bd, 1 Aufl, Cuvillier Verlag, S. 1-138 (2003).

**[56] Musyanovych A, Adler HJ.** Grafting of amino functional monomer onto initiator-modified polystyrene particles.

*Langmuir* 2005 21:2209-2217.

**[57] Musyanovych A, Rossmann R, Tontsch C, Landfester K.** Effect of hydrophilic comonomer and surfactant type on the colloidal stability and size distribution of carboxyl- and amino-functionalized polystyrene particles prepared by miniemulsion polymerization.

*Langmuir* 2007 23:5367-5376.

**[58] Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allemann E.** Biodegradable nanoparticles for direct or two-step tumor immunotargeting.

*Bioconjug Chem* 2006 17:139-145.

---

[59] **Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kühl U.** Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy.

*Circulation* 1999 99:2124-2131.

[60] **Owens DE 3rd, Peppas NA.** Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.

*Int J Pharm* 2006 307:93-102.

[61] **Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP.** Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio.

*Circulation* 1999 99:2750-2756.

[62] **Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D.** Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts.

*Environ Health Perspect* 2002 110:797-800.

[63] **Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P.** Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies.

*Circulation* 1996 93:841-842.

[64] **Roberts WC, Siegel RJ, McManus BM.** Idiopathic dilated cardiomyopathy: analysis of 152 necropsy patients.

*Am J Cardiol* 1987 60:1340-1355.

[65] **Roberts WC.** Cardiomyopathy and myocarditis: morphologic features.

*Adv Cardiol* 1978 22:184-198.

---

**[66] Rolland A, Bourel D, Genetet B, Le Verge R.** Monoclonal antibodies covalently coupled to polymethacrylic nanoparticles: in vitro specific targeting to human T lymphocytes.

*Int J Pharm* 1987 39:173-180.

**[67] Sánchez-Martín RM, Alexander L, Bradley M.** Multifunctionalized biocompatible microspheres for sensing.

*Ann N Y Acad Sci* 2008 1130:207-217.

**[68] Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Segawa I, Hiramori K.** Myocardial osteopontin expression is associated with collagen fibrillogenesis in human dilated cardiomyopathy.

*Eur J Heart Fail* 2005 7:755-762.

**[69] Schäfer V, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H, Gerte S, von Briesen H.** Influence of HIV-infection on the phagocytic activity of monocytes/macrophages and granulocytes.

*Clin Diagn Virol* 1994 1:279-287.

**[70] Schäfer V, von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Steffan AM, Royer C, Kreuter J.** Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages.

*J Microencapsul* 1994 11:261-269.

**[71] Schultheiss HP, Kühl U.** Endomyocardial biopsy in cardiomyopathy: when and why?

*Dtsch Med Wochenschr* 2009 134:769-772.

**[72] Sigusch HH, Reinhardt D, Figulla HR.** Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis.

*Med Klin Munich* 1998 93:236-239.

- 
- [73] **Simon BH, Ando HY, Gupta PK.** Circulation time and body distribution of <sup>14</sup>C-labeled amino-modified polystyrene nanoparticles in mice.  
*J Pharm Sci* 1995 84:1249-1253.
- [74] **Sliwa K, Damasceno A, Mayosi BM.** Epidemiology and etiology of cardiomyopathy in Africa.  
*Circulation* 2005 112:3577-3583.
- [75] **Spänkuch B, Steinhauser I, Wartlick H, Kurunci-Csacsco E, Strebhardt KI, Langer K.** Downregulation of Plk1 expression by receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles.  
*Neoplasia* 2008 10:223-234.
- [76] **Speiser PP:** Nanopartikel. Müller RH, Hildebrand GE (Hrsg) Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneimittelformen, 2 Bd , 1 Aufl, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 339-356 (1999).
- [77] **Stayton PS, Hoffman AS, Murthy N, Lackey C, Cheung C, Tan P, Klumb LA, Chilkoti A, Wilbur FS, Press OW.** Molecular engineering of proteins and polymers for targeting and intracellular delivery of therapeutics.  
*J Control Release* 2000 65:203-220.
- [78] **Steinhauser I, Spänkuch B, Strebhardt K, Langer K.** Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells.  
*Biomaterials* 2006 27:4975-4983.
- [79] **Stern ST, McNeil SE.** Nanotechnology safety concerns revisited.  
*Toxicol Sci* 2008 101:4-21.
- [80] **Sugrue DD, Rodeheffer RJ, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V, Gersh BJ.** The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study.  
*Ann Intern Med* 1992 117:117-123.

---

**[81] Taylor JR, Fang MM, Nie S.** Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles.

*Anal Chem* 2000 72:1979-1986.

**[82] Thiesen B, Jordan A.** Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia.

*Int J Hyperthermia* 2008 24:467-474.

**[83] Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG.** Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy.

*Circulation* 1998 97:1708-1715.

**[84] Torp A.** Incidence of congestive cardiomyopathy.

*Postgrad Med J* 1978 54:435-439.

**[85] Towbin JA.** Inflammatory cardiomyopathy: there is a specific matrix destruction in the course of the disease.

*Ernst Schering Res Found Workshop* 2006 55:219-250.

**[86] Tröster SD, Kreuter J.** Influence of the surface properties of low contact angle surfactants on the body distribution of <sup>14</sup>C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles.

*J Microencapsul* 1992 9:19-28.

**[87] Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E, Mao HQ, Guggino WB, August JT, Leong KW.** Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres.

*Arch Biochem Biophys* 1999 361:47-56.

**[88] van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM.** Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery.

*Pharm Re* 2007 24:1405-1414.

- 
- [89] **Vijayanathan V, Thomas T, Thomas TJ.** DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy.  
*Biochemistry* 2002 41:14085-14094.
- [90] **Vincenzo Fragola P, Autore C, Picelli A, Sommariva L, Cannata D, Sangiorgi M.** Familial idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*Am Heart J* 1988 115:912-914.
- [91] **Warheit DB.** How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?  
*Toxicol Sci* 2008 101:183-185.
- [92] **Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K.** Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells.  
*J Drug Target* 2004 12:461-471.
- [93] **Wattendorf U, Merkle HP.** PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles.  
*J Pharm Sci* 2008 97:4655-4669.
- [94] **Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K.** Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles.  
*Int J Pharm* 2000b 194:91-102.
- [95] **Weber C, Kreuter J, Langer K.** Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles.  
*Int J Pharm* 2000a 196:197-200.
- [96] **Wilkins DJ.** Fluorescent labelling of polystyrene latex for tracing in biological systems.  
*Nature* 1964 202:798-799.



---

[97] **Zimmer A, Kreuter J, Robinson JR.** Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues.

*J Microencapsul* 1991 8:497-504.

[98] **Zimmer A, Mutschler E, Lambrecht G, Mayer D, Kreuter J.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of an ophthalmic pilocarpine nanoparticle-delivery-system.

*Pharm Res* 1994 11:1435-1442.

[99] **Zimmermann O, Grebe O, Merkle N, Nusser T, Kochs M, Bienek-Ziolkowski M, Hombach V, Torzewski J.** Myocardial biopsy findings and gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance in dilated cardiomyopathy.

*Eur J Heart Fail* 2006 8:162-166.

[100] **Zimmermann O, Kochs M, Zwaka TP, Kaya Z, Lepper PM, Bienek-Ziolkowski M, Hoher M, Hombach V, Torzewski J.** Myocardial biopsy based classification and treatment in patients with dilated cardiomyopathy.

*Int J Cardiol* 2005 104:92-100.

[101] **Zwaka TP, Manolov D, Ozdemir C, Marx N, Kaya Z, Kochs M, Höher M, Hombach V, Torzewski J.** Complement and dilated cardiomyopathy: a role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in cardiac myocytes.

*Am J Pathol* 2002 161:449-457.

## 7 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem ärztlichen Direktor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Ulm, **Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach**, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Jan Torzewski** für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die stetige Anteilnahme am Fortschreiten meiner Arbeit.

**Herrn Dr. med. Oliver Zimmerman** danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung. Seine Geduld beim Einarbeiten in die Thematik und seine Vermittlung zwischen den mitarbeitenden Abteilungen haben im Wesentlichen zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau **Dr. hum. biol. Juliane Wiehe** bedanke ich mich ganz herzlich für Ihre fürsorgliche und kompetente Betreuung, die geduldige Einarbeitung in die „Welt“ eines Forschungslabors und die vielen kleinen kommunikativen und technischen Arbeitsschritte, die sie mir abgenommen hat. Vor allem von der Möglichkeit immer wieder Fragen zu stellen, welche kompetent und schnell beantwortet wurden, habe ich bis zum Ende dieser Arbeit profitiert. Vielen Dank liebe Juliane!

Frau **Dr. Anna Musyanovych** und **Frau Prof. Dr. med Katharina Landfester** danke ich für die Bereitstellung der Nanopartikel und Ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik.

Dr. rer. nat. Myriam Lorenz und Martin Daß, sowie Karin Fuchs und PD Dr. Volker Mailänder danke ich für die produktive Zusammenarbeit.

**Meinen Eltern** danke ich von ganzem Herzen für Ihre bedingungslose Unterstützung, Ihre Ermutigungen und Bestärkungen mein ganzes Studium hindurch. Mit Euch an meiner Seite habe ich mein Ziel nie aus den Augen verloren. Ich bin froh, dass es Euch gibt!

Großer Dank gebührt meiner geliebten **Großmutter**, die immer für mich da war!

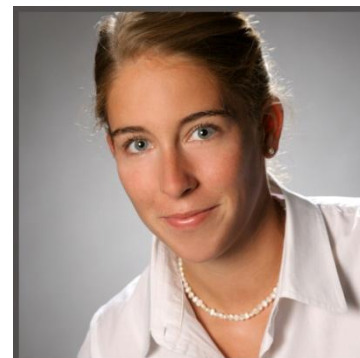
Bei **meinen Geschwistern** Katja und Maximilian bedanke ich für den „geschwisterlichen“ Beistand, der jede Distanz überwunden hat.

Schließlich danke ich **meinem Freund Roman Hahlbrock**, mit ihm zusammen ist mein Medizinstudium zur bisher schönsten Zeit meines Lebens geworden.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nina Winter  
 Geburtstag/-ort: 04.11.1982 in Aachen  
 Anschrift: Schillingstr.43, 50670 Köln  
 Familienstand: ledig  
 Mutter: Ute Winter, geb. Bausen, Kinderkrankenschwester  
 Vater: Dr. med. Hartmut Friedrich Winter, Orthopäde  
 Geschwister: Katja Winter, Medizinstudentin  
 Maximilian Winter, Abiturient



### Dissertation

Dez.2006- Sept. 2009 „Generierung eines molekularen Kontrastmittels auf der Grundlage von antikörpergekoppelten Nanopartikeln zur spezifischen Antigendetektion. -Proof of the Principle-“

Experimentelle Arbeit im molekularbiologischen Forschungslabor der Abteilung Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm, Prof. Dr. Hombach AG Prof. Dr. Torzewski.

### Ärztliche Prüfungen

Dez.2008 Approbation zur ärztlichen Tätigkeit  
 Staatsexamen nach neuer AO an der Universität Ulm  
 Aug.2004 Ärztlichen Vorprüfung an der Semmelweis Universität  
 Budapest, Ungarn

---

**Ausbildung**

- Okt. 2004 – Dez. 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm.  
Abgeschlossen am 04.12.2008 mit dem Staatsexamen.
- Sept. 2002 – Aug. 2004 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis  
Universität, Budapest, Ungarn. Abgeschlossen am  
26.08.2004 mit dem Physikum.

**Schulbildung**

- 1993 – 2002 Erzbischöfliches Suitbertus Gymnasium, Düsseldorf
- 1989 – 1993 Franz Vaahsen Grundschule, Düsseldorf

**Nebentätigkeiten**

- 2009 Dozentin an der Akademie für Gesundheitsberufe des  
Universitätsklinikums Ulm, Wiblingen
- 2005-2007 Wissenschaftliche Hilfskraft beim OSCE- Chirurgie  
(Viszeralchirurgie Universitätsklinikum Ulm)
- 2004-2008 Aktives Mitglied des Musischen Zentrums, Ulm  
(F.W. Ayer, Artist in Residence, Universität Ulm)