

Einfluss unterschiedlicher polymerer Nanopartikel auf das Differenzierungsverhalten von humanen Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz

Ivonne Brüstle

geb. am 31.03.1983 in Reusten

Mainz, 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	5
2	Einleitung	7
3	Motivation/Fragestellung	9
4	Theorie	11
4.1	Definition Stammzellen	11
4.2	Humane mesenchymale Stammzellen (human mesenchymal stem cells, hMSCs) 12	
4.2.1	Charakterisierung.....	12
4.2.2	Multilineage Differenzierung.....	14
4.2.3	Immunmodulatorische Eigenschaften	20
4.2.4	Medizinische Anwendungsmöglichkeiten	21
4.3	Hämatopoetische Stammzellen	23
4.3.1	Erythropoese.....	25
4.3.2	Granulopoese.....	27
4.3.3	Megakaryopoese.....	28
4.3.4	Therapeutische Anwendung	29
5	Nanopartikel in biologischen Systemen	30
5.1	Nanomedizin – Anwendung von NP im klinischen Bereich	32
5.1.1	Markierung von Stammzellen für die medizinische Bildgebung	33
5.1.2	Drug delivery/Gentherapie	35
5.2	Interaktion von Nanopartikeln und (Stamm) Zellen	36
5.3	Nanotoxikologie	39
6	Methoden	43
6.1	Homogeneous time resolved fluorescence (HTRF®).....	43
6.2	Durchflusszytometrie	45

6.3	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, cLSM)	46
6.4	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)	48
7	Material	51
7.1	Geräte	51
7.2	Verbrauchsmaterial	52
7.3	Reagenzien	52
8	Durchführung	55
8.1	Zellkultur	55
8.2	Durchflusszytometrie	55
8.3	cLSM Probenvorbereitung	56
8.4	Differenzierung von hMSCs	57
8.4.1	Adipogene Differenzierung	57
8.4.2	Chondrogene und osteogene Differenzierung	57
8.5	Histologische Färbungen	58
8.5.1	Nachweis der Alkalischen Phosphatase	58
8.5.2	Methylenblau Färbung	58
8.5.3	Oil Red-O Färbung	58
8.6	Differenzierung von hHSCs	59
8.7	CD-Oberflächenmarker Färbung	60
8.8	Pappenheim-Färbung	60
8.9	RNA-Isolierung	61
8.10	cDNA-Synthese	61
8.11	Quantitative real-time-PCR (qPCR)	62
8.12	HTRF-Assay	64

8.13	Probenvorbereitung für MRT Messung.....	64
8.14	MRT Messung	64
8.15	Auswertung der MRT Messdaten	65
8.16	H ¹ NMR Messung.....	65
8.17	UV/VIS Messung	66
8.18	Berliner Blaufärbung.....	66
8.19	Statistische Analyse	66
9	Ergebnisse und Diskussion	67
9.1	Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel	67
9.2	Interaktion von Nanopartikeln mit hMSCs ^[225]	69
9.2.1	Partikelaufnahme und Toxizität.....	69
9.2.2	Zytokinsekretion	73
9.2.3	Einfluss der Nanopartikel auf das Differenzierungsverhalten.....	74
9.3	Interaktion von Nanopartikeln mit hHCSs ^[246]	83
9.3.1	Partikelaufnahme und Toxizität.....	83
9.3.2	Zytokinsekretion	88
9.3.3	Differenzierungsverhalten unter Nanopartikel Einfluss	89
9.4	Einfluss unterschiedlicher BMP-2 Peptide auf das Differenzierungsverhalten von hMSCs.....	97
9.5	Markierung von Zellen für eine Darstellung im MRT	101
9.5.1	MRT-Messungen	101
9.5.2	Quantitative Eisenmessungen	104
9.5.3	Zellmarkierungen mit eisenhaltigen Nanopartikeln	105
10	Zusammenfassung und Ausblick.....	113
11	Summary and outlook.....	115
12	Literatur	117

Inhaltsverzeichnis

13	Publikationen	136
14	Eidesstaatliche Erklärung	138

1 Abkürzungsverzeichnis

hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
PBS	phosphate buffered saline
FACS	Fluorescence activated cell sorter
hHSC	Humane hämatopoetische Stammzellen
7 AAD	7-Aminoactinomycin
FSC	Forward Scatter
SSC	Sideward Scatter
RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IL	Interleukin
EPO	Erythropetin
TPO	Thrombopoetin
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating facto
CD Marker	Cluster of Differentiation Marker
qPCR	Quantitative Real Time PCR
PCR	Polymerase chain reaktion, dt: Polymerase Kettenreaktion
GABDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
B2M	β2 Mikroglobulin
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence
FRET	Förster – Resonanzenergietransfer
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
NP	Nanopartikel
BMP 2	Bone morphogenic protein 2



2 Einleitung

„Nanotechnologie hat in fast allen Bereichen des alltäglichen Lebens und in viele Forschungsbereiche Einzug gefunden und stellt eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts dar, die unsere Eintrittskarte in die Zukunft ist“, so die Bundesministerin für Bildung und Forschung Dr. Annette Schavan in ihrem Vorwort zur Nano-Initiative Aktionsplan 2010 der deutschen Bundesregierung (BMBF 2006). Das Spektrum der Nanotechnologie reicht von Kosmetik über Haus- und Bautechnik bis hin zu raffinierter Oberflächenbeschichtungen bei Kleidung und schließlich zur Nanoelektronik. Zum Beispiel werden Metalloxid-Nanopartikel wie z.B. TiO_2 häufig in Kosmetikprodukten und Nahrungsmittelfertigprodukten eingesetzt ^[1].

Wird Nanotechnologie mit medizinischen Anwendungen kombiniert, wird dies als Nanomedizin bezeichnet. Dieser Begriff tauchte in der wissenschaftlichen Literatur gegen Ende des letzten Jahrhunderts auf ^[2]. Seitdem hat die Entdeckung und Entwicklung von neuen Medikamentenformen, neuem Implantationsmaterial und molekularen Maschinen auf „Nano“-Ebene eine kleine Revolution im Bereich der kontrollierten Medikamentenfreisetzung, der Diagnosemethoden, des Gewebeersatz und der Chirurgie geführt. Für einen unbedenklichen Einsatz von Nanomaterialien in der Medizin ist es jedoch zwingend erforderlich, die damit einhergehenden Risiken genau zu untersuchen. Hierbei gilt es zu klären, wie das Material mit Mensch und Tier wechselwirkt: Ist es giftig (akute oder chronische Toxizität), kann es Krebs erzeugen (Kanzerogenität), das Erbgut beeinflussen (Mutagenität) oder negative Auswirkungen auf ungeborenes Leben haben (Teratogenität)? Sind solche grundlegenden Fragen geklärt, entscheiden Zulassungsbehörden wie die *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA oder die *European Medicines Agency* (EMA) in Europa über die Zulassung eines neuen Materials für die medizinische Anwendung. Im Bereich der für medizinische Zwecke eingesetzten Nanomaterialien gibt es zahlreiche klinische Versuchsreihen, und eine Vielzahl der Materialien wurden bereits von der FDA für den Einsatz im Menschen freigegeben ^[3-5]. Eine weitere Reihe von unterschiedlichen Materialien werden momentan in Zellkultur und Kleintiermodellen auf ihre medizinische Verwendung hin

untersucht ^[6-8]. Eines der Hauptanwendungsgebiete dieser neuartigen Nanomaterialien ist die zielgerichtete Ansteuerung von Tumoren, um so entweder Chemotherapeutika oder Kontrastmittel für die diagnostische Bildgebung direkt vor Ort zu applizieren.

Nicht nur die Anwendung von Nanotechnologie in der Medizin ist in den letzten Jahren stark in den Fokus der Forschung gerückt, sondern auch die therapeutische Anwendung von adulten Stammzellen. Während die hämatopoetischen Stammzellen (hHSCs) schon seit mehreren Jahrzehnten in Form von Knochenmarkstransplantationen bei bestimmten Blutkrebsformen eingesetzt werden ^[9, 10], ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) erst in den letzten 15 Jahren zum Gegenstand der medizinischen Forschung geworden. Diese beiden Stammzellarten bergen ein großes Potential zur Behandlung zahlreicher schwerwiegender Krankheiten. Die Kombination dieser therapeutisch interessanten Stammzellen mit nanoskaligen Biomaterialien könnte zur noch besseren und neuen Behandlungsmethoden im Bereich von Krebs-, Autoimmun- oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen. Diese Kombination benötigt jedoch umfangreiche Kenntnis über zellbiologische und materialtechnische Grundlagen, denn sie wirft neue Fragen über Zelldifferenzierung, Zellmigration, Stoffwechsellistung und Materialstabilität, also über die gegenseitige Beeinflussung der Komponenten, auf. Es muss gewährleistet sein, dass sich die Stammzelle, wenn sie in Kontakt mit dem Nanomaterial gekommen ist, sich immer noch wie eine solche verhält, gleiches gilt für das Nanomaterial. Nur unter diesen Umständen ist eine sichere Anwendung von Stammzellen und Nanomaterialien in der Medizin möglich.

3 Motivation/Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss unterschiedlicher Parameter von Nanopartikeln auf die Differenzierung von zwei Stammzellpopulationen zu untersuchen. Als Stammzellen wurden hMSCs und hHSCs gewählt, da diese beiden Stammzellpopulationen medizinisch interessant sind.

Für eine systematische Analyse des Partikeleinflusses ist es wichtig, möglichst immer nur eine Eigenschaft der Partikel zu ändern, da es sonst schwierig bis unmöglich wird, eventuell beobachtete Effekte auf eine Eigenschaft zurückzuführen. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen sowie dem Vergleich von bioinerten und bioabbaubaren Polymeren. Zudem soll der Einfluss unterschiedlicher Tenside untersucht werden. Zu diesem Zweck werden Partikelpaare mit einem funktionalisierten und einem unfunktionalisierten Partikel gewählt, die ungefähr gleich groß sind und sich in weiteren Eigenschaften nicht unterscheiden. Als bioinertes Material wurde Polystyrol gewählt, welches in der Arbeitsgruppe schon lange eingesetzt wird. Als bioabbaubares Polymer wurde PLLA gewählt, welches ebenfalls in der Abteilung bereits in der Zellkultur getestet wurde.

In Hinblick auf eine potentielle spätere klinische Anwendung solcher Nanopartikel müssen zwei Dinge gewährleistet sein, bevor eine detaillierte molekularbiologische Untersuchung ihres Einflusses auf die Differenzierung erfolgen kann. Erstens sollten die Partikel in einer adäquaten Menge aufgenommen werden und zweitens nach einer Aufnahme nicht toxisch sein.

Hierzu müssen folgende Fragen geklärt werden:

1. Beeinflussen die gewählten Nanopartikel bzw. Komponenten dieser Nanopartikel die Zelldifferenzierung in histologischen Untersuchungen?
2. Beeinflussen diese die Expression von Markerantigenen?
3. Beeinflussen diese die Transkription von Markergenen für die Differenzierung?

4. Kann man dem Verständnis der Beeinflussung von Nanopartikeln auf diese Parameter näher kommen?

Außerdem sollte die gezielte Beeinflussung durch eine mögliche Beladung der Nanopartikel oder Nanokapseln mit Differenzierungsfaktoren untersucht werden. Hier sollten BMP-2-Peptide untersucht werden, die als Fracht in solchen Nanocarriern die schwieriger einkapselbaren vollständigen Proteine ersetzen sollten.

Für eine wirkungsvolle Anwendung von Zelltherapien auch in Kombination mit Nanopartikeln ist es notwendig, die Biodistribution der applizierten Zellen im Körper nachzuverfolgen. Dies kann mit Hilfe markierter Zellen erfolgen, die im Körper mittels Magnetresonanztomographie (MRT) detektiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten geeignete Quantifizierungsmethoden für den Nachweis eisenmarkierter Zellen etabliert werden.

Die Zellaufnahme und Toxizität aller in der Arbeit verwendeten Partikel wird mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Anschließend, wenn die Partikel eine ausreichende Zellaufnahme sowie keine Toxizität vorweisen, werden sie in *in vitro* Differenzierungen der Stammzellen eingesetzt. Die Differenzierung der Stammzellen wird mit Hilfe von histologischen Färbungen (hMSCs) bzw. CD-Marker-Färbungen (hHSCs) sowie qPCR-Analysen unterschiedlicher Differenzierungsmarker nachgewiesen. Diese beiden Methoden erlauben zum einen eine qualitative (Färbungen) als auch eine quantitative (qPCR) Beurteilung der Differenzierung und somit auch des Partikeleinflusses.

Am Ende der Arbeit soll so ein systematischer Überblick über den Einfluss unterschiedlicher Materialien sowie unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen auf beide verwendeten Stammzellpopulationen erzielt werden.

4 Theorie

4.1 Definition Stammzellen

Stammzellen besitzen eine Sonderstellung unter den Zellen. Sie sind in der Lage sich selbst immer wieder zu teilen und hierbei Tochterzellen zu erzeugen, die ebenfalls über einen Stammzellcharakter verfügen. Hierbei teilen sie sich im Körper über die Dauer einer Lebensspanne immer wieder^[11]. Neben dieser Eigenschaft sind Stammzellen auch in der Lage, sich in unterschiedliche Ziellinien zu differenzieren. Diese Vorläuferzellen einer differenzierten Zelle entstehen aus asymmetrischen Teilungen der Stammzellen. Hierbei entsteht sowohl eine neue Stammzelle als auch eine Vorläuferzelle.

Stammzellen werden anhand ihres Differenzierungspotentials in Gruppen unterteilt (Abbildung 1):

- Totipotent:
Diese Zellen sind in der Lage, einen kompletten Embryo auszubilden. Diese Eigenschaft hat nur eine Zygote, sowie die Zellen der zwei darauf folgenden Teilungen.
- Pluripotent:
Diese Zellen sind in der Lage, Zellen aus allen drei Keimblättern hervorzubringen. Nur embryonale Stammzellen besitzen diese Eigenschaft.
- Multipotent:
Diese Zellen sind in der Lage, Zellen aus unterschiedlichen Geweben zu bilden. Mesenchymale und hämatopoetische Zellen besitzen diese Eigenschaft.
- Unipotent:
Diese Zellen können sich nur noch in Zellen ihres eigenen Typs teilen, besitzen jedoch immer noch die Fähigkeit der Selbsterneuerung.

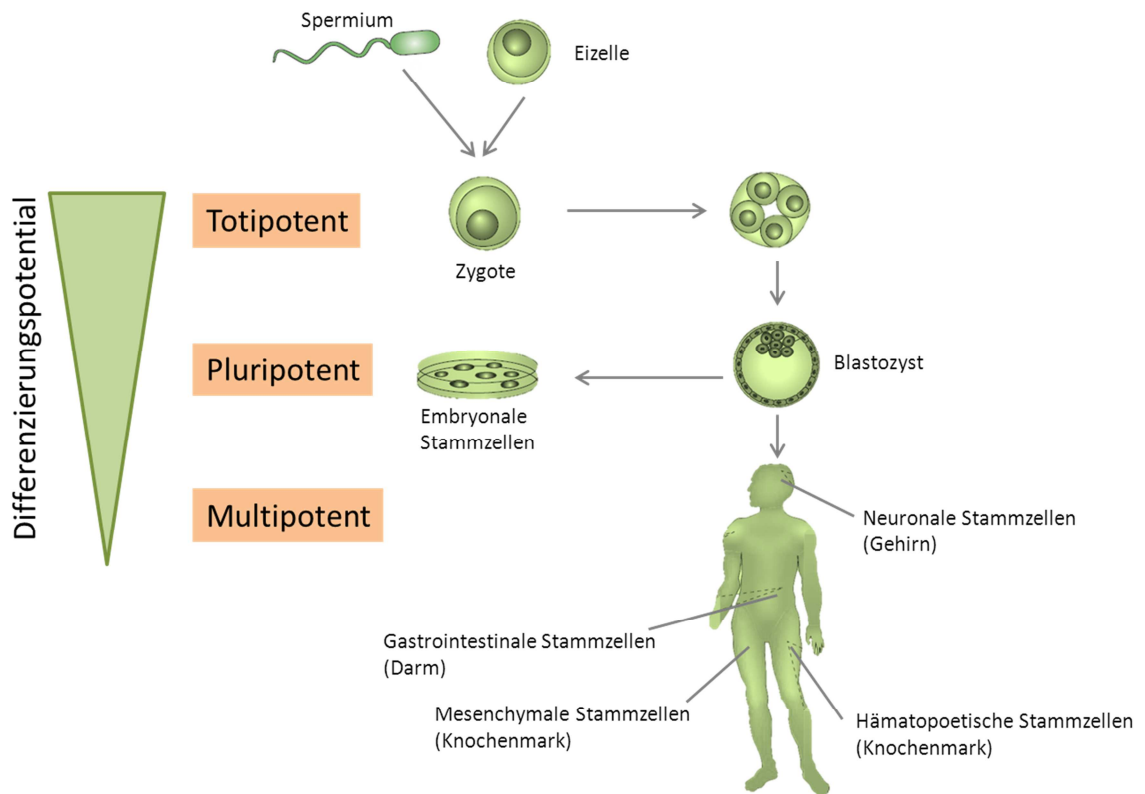


Abbildung 1: Differenzierungspotential unterschiedlicher Stammzellen. Modifiziert nach ^[12].

Stammzellen sind in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe im menschlichen Körper zu finden und stellen dort den Erhalt des jeweiligen Gewebes sicher. Hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, die beide im Knochenmark zu finden sind, stellen hierbei die für die medizinische Forschung interessantesten Stammzellpopulationen dar.

4.2 Humane mesenchymale Stammzellen (human mesenchymal stem cells, hMSCs)

4.2.1 Charakterisierung

Der erste Nachweis von fibroblastenartigen Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert und in Knochengewebe differenziert werden konnten, stammte von Friedenstein (Moskau) in den 1960 Jahren. Dieser führte seine ersten *in vitro* Kultivierungen mit Zellen aus dem Knochenmark von Meerschweinchen durch ^[13-15]. Hierbei konnte er zeigen, dass diese *ex vivo* kultivierten Zellen, wenn sie unter die Haut gepflanzt wurden,

sich zu Knochen- und Knorpelzellen entwickelten. In weiteren Arbeiten konnten Friedenstein und seine Kollegen die Existenz von plastikadhärenten Zellen im Knochenmark nachweisen, die in der Lage waren, „*single cell derived*“ Kolonien zu bilden. Diese adhärenen Zellen wuchsen *in vitro* zu rundlichen Kolonien heran, die fibroblastenähnliche Zellen enthielten, dies führte zu dem Begriff „*colony-forming unit fibroblasts*“ (CFU-f). Einige dieser Zellen waren in der Lage sich in Knochen- und Knorpelgewebe zu differenzieren ^[13, 16]. Auf Grund ihrer Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit wurden diese Zellen von Caplan 1991 zum ersten Mal als Stammzellen angesehen und als mesenchymale Stammzellen bezeichnet ^[17] (Abbildung 2). Diese herausragenden Eigenschaften machten diese Zellen zum Gegenstand intensiver Forschung, welche 1999 in einer Science Veröffentlichung von M.F. Pittenger ^[18] resultierte, in der zum ersten Mal die Fähigkeit der hMSCs beschrieben wurde, sich unter geeigneten Bedingungen in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen zu differenzieren.

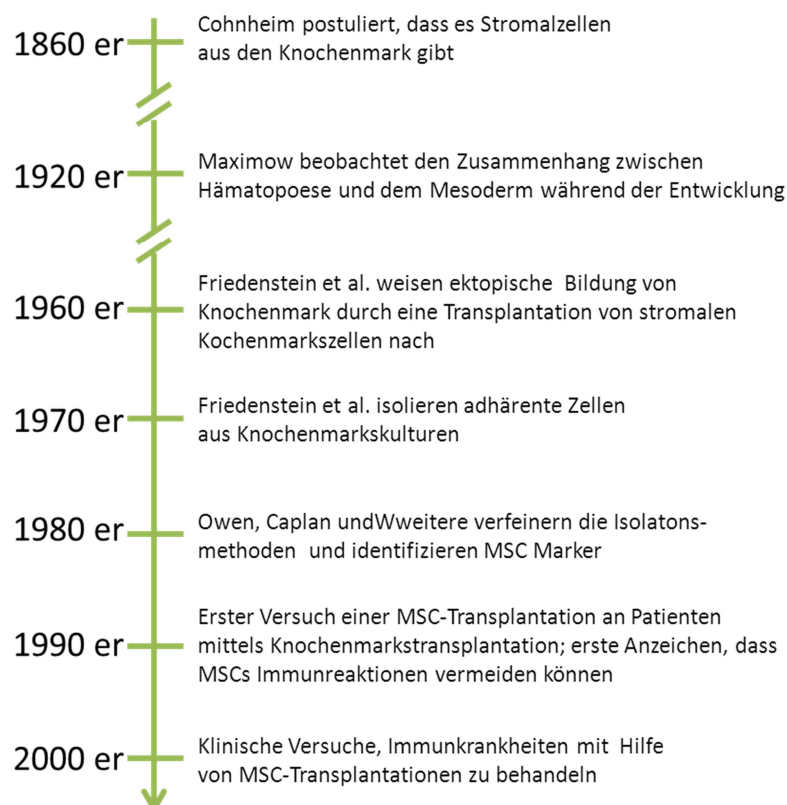


Abbildung 2: Entwicklung der MSC Forschung. Übernommen von ^[19].

In der Gemeinschaft der Forscher wurde immer wieder kontrovers diskutiert, ob es sich bei den oben beschriebenen Zellen tatsächlich um Stammzellen oder nur um Vorläuferzellen handelt. Neben der heute gebräuchlichen Bezeichnung mesenchymale Stammzellen wurden und werden auch die Bezeichnungen mesenchymale Stromalzellen^[20], *colony forming unit fibroblast* (CFU-F) oder *multipotent adult progenitor cells* (MAPCs) verwendet^[21].

hMSCs konnten nicht nur aus dem Knochenmark, sondern aus fast allen Bindegeweben isoliert werden^[22]. Die Hauptquelle für weitere Forschungsarbeiten bleibt jedoch das Knochenmark. Die Identifizierung und Charakterisierung von hMSCs *in vitro* wird vor allem durch ihre Fähigkeit der Plastikadhärenz und ihres Differenzierungspotentials in Fett, Knochen und Knorpel begründet. Eine einheitliche Charakterisierung mittels CD (*cluster of differentiation*)-Oberflächenmarkern ist nur begrenzt möglich, da *in vitro* kultivierte hMSCs keine Marker exprimieren, die nur auf diesen Zellen vorkommen. Es gibt jedoch den allgemeinen Konsens, dass hMSCs keine der üblichen hämatopoetischen Marker (CD34, CD45 und CD14) tragen. Abhängig vom Spender, der Gewebequelle und den Kulturbedingungen exprimieren hMSC in unterschiedlichen Mengen folgende Marker: CD71 (Transferrin Rezeptor), CD73 (Ecto-5-nucleotidase) und CD105 (Endoglin)^[18, 23].

4.2.2 Multilineage Differenzierung

Das Differenzierungspotential von hMSCs beschränkt sich nicht nur auf die schon erwähnten Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten, ebenso können sie auch in andere mesenchymale Zellen wie Myoblasten, Kardiomyozyten und Hepatozyten (zusammengefasst in^[24]) differenzieren. Im Hinblick auf eine potentielle Anwendung in der regenerativen Medizin sind jedoch die genannten Differenzierungsrichtungen adipogen, chondrogen und osteogen am interessantesten und auch am besten untersucht. Die Differenzierung von hMSCs zu spezifischen Zellen wie Osteoblasten ist ein zeitlich eng kontrollierter Prozess, der das Zusammenspiel unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren beinhaltet. Der Vergleich von Genexpressionsprofilen unterschiedlicher differenzierter Zellen mit nicht-differenzierten

hMSCs trägt dazu bei, die molekularen Mechanismen der Differenzierung besser zu verstehen [25-27]. Diese Daten ermöglichen auch die Identifikation spezifischer Differenzierungsmarker, die in qPCR- oder Westernblotanalysen zum Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung herangezogen werden können.

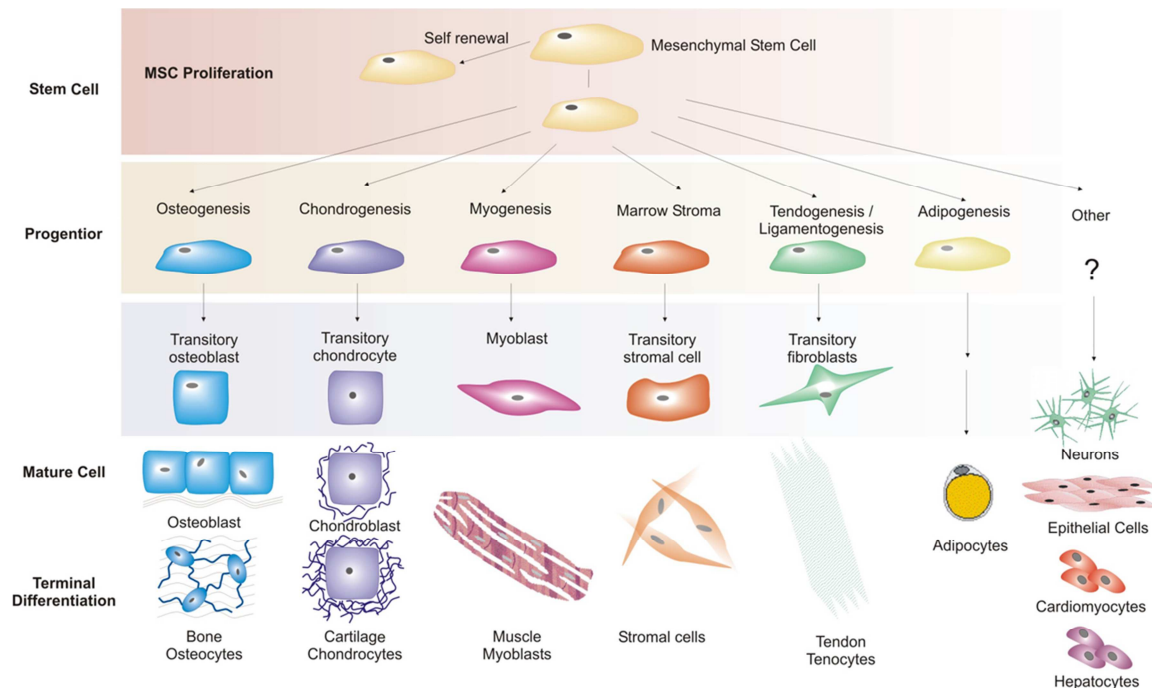


Abbildung 3: Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen, modifiziert nach [24], Copyright BTR©.

4.2.2.1 Adipogene Differenzierung

Während der adipogenen Differenzierung wandeln sich die spindelförmigen hMSCs in rundliche Adipozyten, die Triglyzeride in Form von Fettvakuolen speichern. Dieser Prozess geschieht schrittweise, wobei sich die hMSCs zuerst in Präadipozyten verwandeln. Diese teilen sich solange, bis sie eine konfluente Zelllage bilden, um abschließend reife Adipozyten zu bilden (Abbildung 4) [28]. Um diese Differenzierung *in vitro* zu erzielen, werden hMSCs mit einem Cocktail aus Dexamethason, Indomethacin, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) und Insulin inkubiert. Das Glukokortikoid Dexamethason bewirkt hierbei die Anhäufung von Transkriptionsfaktoren wie *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBPs) und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2* (PPAR- γ 2), diese sind essentiell für die Umwandlung von Vorläuferzellen zu Adipozyten [29]. Auch IBMX bewirkt eine höhere Expression von PPR- γ 2 und

Lipoproteinlipase (LPL), während es gleichzeitig die Expression bestimmter osteogener Markergene wie RUNX-2 herunterreguliert ^[30-33]. Insulin bewirkt die intrazelluläre Anhäufung von Triglyceriden, über den Akt-TSC2-TORC1 Signalweg.

Eine erfolgreiche Differenzierung kann mit einer Oil-Red-O Färbung nachgewiesen werden. Dieser lipophile Farbstoff färbt die Lipidvakuolen der Adipozyten rot an.

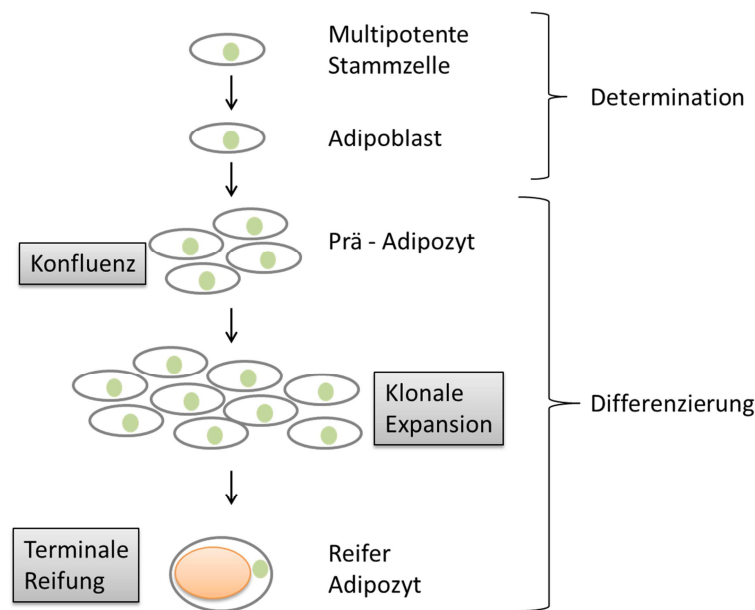


Abbildung 4: Adipogene Differenzierung. Modifiziert nach ^[34].

Die Differenzierung von hMSCs zu Adipozyten stellt einen komplexen Prozess dar, der durch enge zeitliche Regulation einer Vielzahl von stimulierenden und inhibierenden Signalwegen bestimmt wird. Das Zusammenspiel dieser Signalwege führt letztendlich zur Expression hunderter adipogene spezifischer Gene, was sich u. a. in der steigenden Fähigkeit der differenzierenden Zellen, Lipide zu generieren und zu speichern, darstellt ^[35-37]. Ist die Differenzierungsmaschinerie einmal in Gang gebracht, führt das kooperative Zusammenspiel diverser Transkriptionsfaktoren zur Entwicklung reifer Fettzellen. Die beiden wichtigsten Transkriptionsfaktorenfamilien stellen hierbei PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) und C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*) dar ^[38-41]. Als erste Antwort auf die Zugabe eines Differenzierungscocktails (siehe im Text oben) wird die Expression von C/EBP- β und $-\delta$ aktiviert, diese Transkriptionsfaktoren aktivieren wiederum die Expression von PPAR- γ 2 und C/EBP- α ^[42, 43]. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade wird die Expression vieler zur Lipogenese, Lipolyse, Lipidtransport, Insulin Sensitivität und Hormon-Signaling gehörenden Proteine

aktiviert ^[44]. Als Markergene für eine erfolgreiche adipogene Differenzierung dienen u. a. *fatty acid binding protein 4* (FABP4), Metalloproteinase Inhibitor 4 (TIMP4) und *cell death-inducing DFFA-like effector c* (CIDE 3). FABP4 bindet langkettige Fettsäuren und Retinsäure und transportiert sie zu ihren Rezeptoren am Zellkern ^[45]. Die Expression von CIDE 3 wird durch den Transkriptionsfaktor PPAR- γ 2 aktiviert, das daraus resultierende Protein akkumuliert in den entstehenden Fetttröpfchen und fördert dort die Ansammlung unterschiedlicher Lipide ^[46]. TIMP4 spielt eine Rolle in der Umgestaltung der extrazellulären Matrix der Adipozyten ^[47].

4.2.2.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung steht im Fokus der hMSC Forschung, da innovative zellbasierte Behandlungen mit hMSCs auf dem Gebiet der Knochenregeneration vielversprechend sind.

Während der osteogenen Differenzierung entwickeln sich hMSCs in kubische Zellen, die eine hauptsächlich aus Kollagen I bestehende extrazelluläre Matrix sezernieren. Im späteren Verlauf der Differenzierung formen diese Zellen Kalzifizierungs-Aggregate, welche mit Alzarin Rot oder van Kossa-Färbung nachgewiesen werden können. Innerhalb dieser Entwicklung steigt auch die Expression der Alkalischen Phosphatase.

Die Regulation dieser Differenzierung erfolgt auf molekularem Level als Zusammenspiel von unterschiedlichen Hormonen und Transkriptionsfaktoren. Mit Hilfe von Genexpressionsprofilen konnte der zeitliche Ablauf der osteogenen Differenzierung auch auf genetischer Ebene untersucht werden ^[48]. Hierbei zeigte sich, dass in der frühen Phase der Differenzierung hauptsächlich Gene hochreguliert werden, die mit der Zellproliferation in Verbindung stehen. In späteren Phasen der Differenzierung erfolgt dann die Hochregulation der Gene, die für die biologischen Veränderungen während der Differenzierung verantwortlich sind, wie z.B. Wachstumsfaktoren abhängige Signalwege, Adhäsionsmoleküle und knochentypische Proteine.

Im Folgenden werden zwei der für die osteogene Differenzierung wichtigen Signalwege kurz dargestellt.

TGF- β -Signalweg:

Die TGF- β -Superfamilie umfasst mindestens 34 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, zu diesen gehören unter anderem BMPs (bone morphogenic proteins). BMPs haben einen starken Einfluss auf die osteogene Differenzierung. BMP-2 zum Beispiel zeigt in einer Vielzahl von vorklinischen und klinischen Studien eine positive Wirkung bei der Behandlung von Knochendefekten [49, 50].

Das TGF- β -Signaling wird über zwei unterschiedliche Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren vermittelt, deren Ligand-Rezeptor-Komplex SMAD-Proteine rekrutiert, die die Transkription modulieren [51].

Wnt-Signalweg:

Die Wnt/wingless (Wnt) Familie besteht aus einer großen Anzahl an sezernierten Molekülen, die Liganden für die membranständigen „frizzled“ (FZD)-Rezeptoren darstellen. Der kanonische Wnt-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der osteogenen Differenzierung und führt zur Expression osteoblastenspezifischer Markergene [52, 53]. Hierbei wird durch die-Wnt Signalkaskade β -Catenin vom Zytosol in den Kern transportiert, wo es mit Transkriptionsfaktoren der „*T cell factor/lymphoid enhancer factor*“-Familie interagiert [54]. Der Komplex von β -Catenin und T-Zell-Faktor-1 verstärkt die Expression und Aktivität des osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 [55].

Die oben beschriebenen Signalkaskaden führen alle zu einer Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, die für die positive und negative Kontrolle der Genexpression im Zuge der osteogenen Differenzierung verantwortlich sind [56, 57]. Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren ist *runt-related transcription factor 2* (RUNX2), dieser bindet an die Promotoren unterschiedlicher osteogener Markergene wie z.B. Osteocalcin oder Bone sialoprotein [58-63] und sorgt so für deren Expression. Andere osteogene Marker wie Osteopontin oder Osteocalcin werden erst in späteren Phasen der Differenzierung exprimiert [64-67].

Eine *in vitro* Differenzierung in die osteogene Richtung wird durch mehrwöchiges Kultivieren konfluenten hMSCs mit folgenden Zusätzen erreicht: Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat.

Das synthetische Glukokortikoid Dexamethason wird als essentiell für die osteogene Differenzierung angesehen ^[68, 69] und fördert vor allem die Proliferation in den frühen Differenzierungsstadien ^[70]. Des Weiteren verstärkt Dexamethason die Expression des β -Catenin-ähnlichen Moleküls *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) und Integrin $\alpha 5$. Beide Moleküle regen die osteogene Differenzierung durch die Aktivierung der RUNX2-abhängigen Genexpression an. Das Ascorbinsäure-2-Phosphat ist unter anderem für den Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase verantwortlich und unterstützt die Osteocalcin Produktion, ein Hydroxylapatit bindendes Protein in der Knochenmatrix ^[71]. β -Glyzerophosphat, welches während des Differenzierungsprozesses durch die Alkalische Phosphatase hydrolysiert wird, dient als eine Quelle für Phosphat ^[72], welches für die Matrixmineralisierung essentiell ist.

4.2.2.3 Chondrogene Differenzierung

Während der chondrogenen Differenzierung wandeln sich die hMSCs von ihrer charakteristischen fibroblastähnlichen Morphologie in große runde Zellen, die mit einer extrazellulären Matrix umgeben sind. Diese Matrix besteht aus einem hochorganisierten Netzwerk aus Kollagen (hauptsächlich Kollagen-2), Proteoglykanen und Glykosaminglykanen ^[73-75] und kann durch spezielle Färbungen wie Methylenblau nachgewiesen werden.

Einer der wichtigsten und frühen Transkriptionsfaktoren der Chondrogenese ist *SRY-related high-mobility group box 9* (SOX9), der die Expression von Kollagen-2,-9,-10 und Aggrecan steuert ^[76-80].

Eine *in vitro* Differenzierung erfolgt durch die Zugabe eines Cocktails aus Dexamethason, Ascorbinsäure und TGF- β zu einem hMSC-Zellpellet oder einer sehr konfluenten Monolage, diese stellen die für die Differenzierung so wichtigen Zell-Zellkontakte sicher. Das Glukokortikoid Dexamethason wird zur Differenzierung der drei hier beschriebenen Linien verwendet. In der chondrogenen Differenzierung wird es in einer relativ hohen Konzentration von 100 nM ^[81] eingesetzt und führt hauptsächlich zur Expression von Kollagen-11. Ascorbinsäure führt zu einer Kollagenhydroxylierung durch eine Modifikation der Lysin- und Prolinresten. Die Zugabe von TGF- β zum Zellmedium führt zu

einer erhöhten Expression von Kollagen-2, welches das wichtigste Kollagen innerhalb der Knorpelmatrix darstellt ^[82]. TGF- β interagiert mit einem heterodimeren Rezeptorkomplex, der mittels SMAD (*mothers against DPP homologs*)-Proteinen intrazellulär das TGF- β Signal weiterleitet ^[83, 84].

4.2.3 Immunmodulatorische Eigenschaften

Mesenchymale Stammzellen besitzen nachweislich immunmodulatorische Fähigkeiten, wobei das Wirkprinzip noch nicht endgültig geklärt ist. Fest steht, dass beispielsweise Transplantate eine geringere Abstoßungsreaktion hervorrufen, wenn zeitgleich mit der Transplantation mesenchymale Stammzellen intravenös verabreicht werden ^[85].

hMSCs werden durch eine niedrige Expression von MHC-Klasse-I, dem Fehlen von MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II und der Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 charakterisiert ^[86, 87]. Sie sind nicht in der Lage, die Proliferation von allogenen oder xenogenen Lymphozyten zu induzieren ^[87-89]. Die Expression von MHC-Klasse-I und -II-Molekülen wird durch eine Interferon- γ (INF- γ) Behandlung hochreguliert ^[87, 90]. Trotz der INF- γ induzierten Expression von MHC-Klasse-II sind hMSCs nicht in der Lage, Alloreaktivität zu stimulieren ^[87, 89]. Studien haben gezeigt, dass auch die differenzierten Abkömmlinge der hMSCs sich gegenüber T-Zellen gleich verhalten wie nicht-differenzierte hMSCs ^[87, 89]. Auf Grund der genannten Eigenschaften sind hMSCs in der Lage, eine Immunreaktion zu unterdrücken.

Die immunsuppressiven Eigenschaften der hMSCs werden durch das proinflammatorische Zytokin INF- γ und anderen, welche von Immunzellen sekretiert werden, aktiviert ^[91, 92]. Neben Zell-Zellkontakten spielen in der hMSCs-vermittelten Immunsuppression hauptsächlich lösliche Moleküle, deren Sekretion durch den Crosstalk zwischen hMSC und der Zielzellen induziert oder erhöht wird, eine Rolle. hMSCs sekretieren auch Zytokine u.a. IL-6, welches die Monozytendifferenzierung zu dendritischen Zellen inhibiert ^[93, 94]. Zusätzlich verzögert IL-6 die Apoptose von Lymphozyten und Neutrophilen ^[95, 96].

4.2.4 Medizinische Anwendungsmöglichkeiten

Die große Plastizität der hMSCs, ihre immunologischen Eigenschaften, ihre relativ einfache Verfügbarkeit und die Möglichkeit sie *in vitro* zu expandieren (siehe Abbildung 5), eröffnen ein weites Spektrum möglicher klinischer Anwendungen. Von großem Vorteil für eine potentielle Anwendung ist die sowohl *in vitro* ^[89], in vorklinischen Studien ^[85] und in Studien an Menschen ^[97] gezeigte schwache bis nicht vorhandene Immunogenität. Auf Grund dieser Erkenntnisse wäre es möglich, im klinischen Bereich allogene hMSCs zu verwenden. Salem und Thiernemann ^[98] geben eine Übersicht einiger momentan laufender klinischer Studien mit MSCs, die von der Anwendung bei Herzinfarkten über Organversagen bis hin Knochendefekten reichen. Auf der Seite www.clinicaltrials.gov können alle aktuell stattfindenden klinischen Studien (momentan 203, November 2011) eingesehen werden. In vorklinischen Studien mit Pavianen zeigten *ex vivo* expandierte allogene und autologe MSCs eine umfangreiche Biodistribution, die eGFP-markierten Zellen konnten u.a. in der Lunge, im Thymus, in den Knochen, der Haut, im Kleinhirn und im Gastrointestinaltrakt gefunden werden ^[99]. Diese Ergebnisse zeigen, dass MSCs nach einer systemischen Infusion sich in nicht-hämatopoetischen Geweben verteilen und dort eventuell auch Proliferationsfähigkeiten zeigen. Intraarterielle und intravenöse Injektionen von MSCs in Ratten zeigte zu frühen Zeitpunkten ein Anwachsen in der Lunge und zu einem späteren Zeitpunkt in der Leber und in anderen Organen ^[100]. In kardiologischen präklinischen Studien führten MSCs sowohl bei Nagern ^[101] als auch bei Schweinen ^[102] zu einer verbesserten Herzmuskelfunktion nach einem Herzinfarkt.

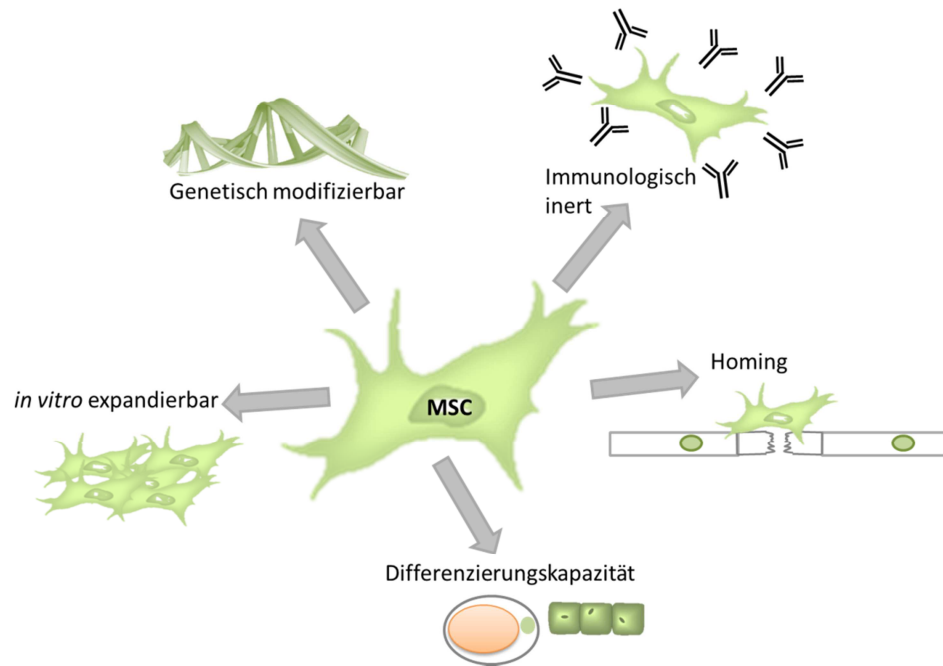


Abbildung 5. Eigenschaften der hMSCs, die für einen klinischen Einsatz relevant sind. Modifiziert nach ^[103].

Ein weites Feld für die therapeutische Anwendung von MSCs auf Grund ihres osteogenen Differenzierungspotentials stellt auch der Bereich der Knochendefekte und Knochenkrankheiten dar. Die Behandlung von angeborenen und erworbenen Knochendefekten mit MSC Injektionen wird schon seit Jahrzehnten untersucht ^[104-107]. Ein moderner Ansatz verknüpft diese MSC-Behandlung mit 3D-Gerüsten aus Biomaterialien ^[108, 109]. Auch bei genetischen Erkrankungen, wie der Glasknochenkrankheit (Osteogenesis imperfecta), wird eine Behandlung (teilweise schon *in utero*) mit Hilfe von MSCs versucht ^[110, 111].

Neben den oben aufgeführten therapeutischen Einsatzmöglichkeiten von hMSCs bieten sich weitere Einsatzgebiete an, die durch folgende Eigenschaften der hMSCs gegeben werden: Einwanderung in Wundbereiche, Bereiche chronischer Entzündungen, Bereiche von geschädigtem Gewebe sowie in Tumorbereiche ^[112].

Auch wenn Stammzellen ein großes Potential für die Behandlung vieler Verletzungen und degenerativen Erkrankungen bieten, so müssen für viele therapeutische Anwendungen noch einige Hindernisse überwunden werden. Dies schließt vor allem die Entwicklung von neuen Technologien ein, die es ermöglichen, die Funktionen der Stammzellen innerhalb ihrer Nischen zu verstehen und transplantierte Stammzellen im

Körper zu verfolgen und zielgerichtet an ihren Wirkungsort zu bringen. Durch die Anwendung von Nanotechnologie im Bereich der Stammzellenforschung wird es möglich, viele dieser Probleme zu lösen. Die Verbindung von Nanotechnologie und im Besonderen Nanopartikel mit aktueller Stammzellforschung wird in Kapitel 5 beschrieben.

4.3 Hämatopoetische Stammzellen

Das hämatopoetische System des Menschen ist lebenslang in der Lage, eine tägliche wechselnde Zusammensetzung von Millionen von Zellen zu produzieren ^[113]. In Summe stellen diese Zellen unser Blut dar, wobei unterschiedliche Zellen verschiedenste Aufgaben wahrnehmen. Die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) sind für den Sauerstofftransport zuständig. Weiße Blutzellen (Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen) sorgen für die Immunabwehr und die Blutplättchen, die von den Megakaryozyten abstammen, sorgen für die Blutgerinnung. All diese Zellen haben nur eine sehr begrenzte Lebensdauer von Stunden bis hin zu mehreren Wochen ^[113], so dass im Körper ständig für Nachschub gesorgt werden muss. Die hämatopoetische Stammzelle ist in der Lage, sich in alle oben genannten Zelltypen des Blutes im Körper zu differenzieren und die zirkulierende Menge an Zellen der jeweiligen physiologischen Situation anzupassen ^[113] (Abbildung 6).

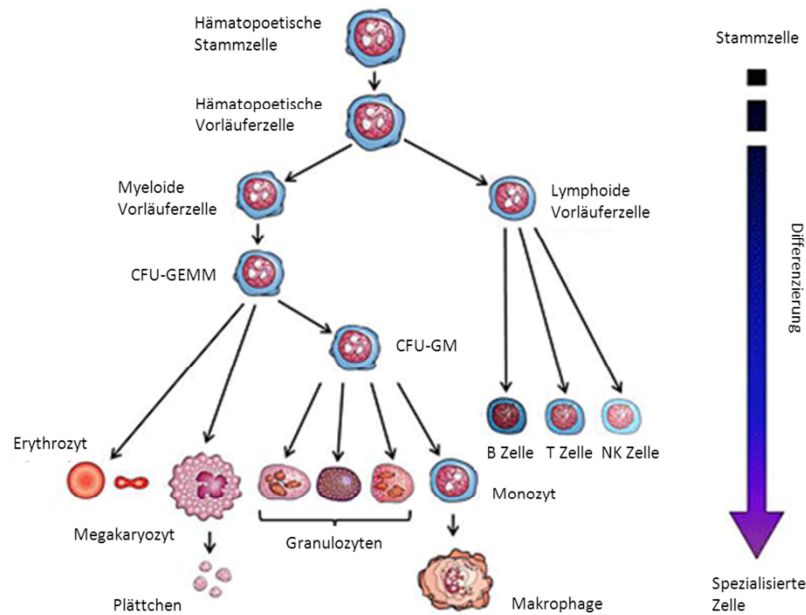


Abbildung 6: Differenzierungsprozess hämatopoetischer Stammzellen. Modifiziert nach www.immuneregen.com.

Als Quelle für die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen dient Knochenmark oder auch Nabelschnurblut. Nach einer Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark mit Hilfe von Wachstumsfaktoren (G-SCF, Granulozyten–Kolonie stimulierender Faktor) können hämatopoetische Stammzellen auch aus dem peripheren Blut gesammelt werden. Im Knochenmark stellt nur ungefähr eine von 10^5 Zellen eine hämatopoetische Stammzelle dar.

Der Oberflächenmarker CD34 stellt im humanen System den am meisten genutzten Marker zur Isolierung von hHSCs dar. Die hierbei erhaltenen Zellpopulation ist jedoch sehr heterogen und setzt sich aus hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen zusammen ^[114]. Als weitere Marker werden zusätzlich auch CD38 (als Negativmarker) ^[115] und CD133 verwendet ^[116]. Mit Hilfe dieser Marker erhält man Zellfraktionen, bei denen nur eine von 70 Zellen eine echte „long term“-hHSC darstellt ^[117]. Die Unterscheidung zwischen „long-term repopulating“ HSC (LT-HSC) und „short-term repopulation“ HSC (ST-HSC) stammt aus Mäusetransplantationsexperimenten. Hierbei zeigte sich, dass zwei Populationen an HSCs existieren. LT-HSC sind in der Lage, über den Zeitraum einer kompletten Lebensspanne eines Individuums alle Zellen des Blutes zu produzieren. Gleichzeitig sind sie auch in der Lage, dies nach einer zweiten Transplantation in einem anderen Individuum fortzuführen ^[117, 118]. Die ST-HSC hingegen

rekonstituieren nur die myeloide und/oder die lymphoiden Bestandteile für eine kurze Zeit ^[118, 119]. Während der Differenzierung durchlaufen hHSCs unterschiedlicher Vorläuferstadien ausgehend von Zellen mit multipotentem Differenzierungspotential bis hin zu Zellen, die sich nur noch in eine hämatopoetische Linie entwickeln können ^[120, 121]. Innerhalb des Differenzierungsprozesses verlieren die hHSCs als erstes die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, proportional dazu steigt die Proliferationsrate der entstehenden Vorläuferzellen sehr stark an, dies führt zu einer enormen Expansionsfähigkeit einer hHSC.

4.3.1 Erythropoese

Rote Blutzellen müssen im Körper ständig nachproduziert werden, da ihre Lebensspanne nur 120 Tage beträgt. Dies geschieht im Prozess der Erythropoese, welche einen dynamischen Prozess darstellt, bei dem sich hämatopoetische Stammzellen über erythrozytäre Vorläuferzellen zu kernlosen roten Blutzellen entwickeln ^[122, 123]. hHSCs werden in ihrer Stammzellnische im Knochenmark von zahlreichen Zell-Zell-Interaktionen und extrinsischen Faktoren (lösliche Makromoleküle) beeinflusst, die mit Rezeptoren der Zelloberfläche interagieren und somit spezielle Signalwege anschalten. Hämatopoetische Vorläuferzellen, die aus unsymmetrischen Teilungen von hHSCs hervorgehen, entwickeln sich zu allgemeinen myeloiden Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*, CMP) und zu allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLP). CMPs entwickeln sich dann zu megakaryozytären/erythrozytären Vorläuferzellen (*megakaryocytic/erythrocytic progenitor*, MEP) und granulozytären-myeloischen Vorläuferzellen (GMP). MEPs werden dann durch die Aktivierung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zu BFU-E (Epo responsive erythroid burst forming unit-erythroid) differenziert, darauf folgen dann die CFU-E (*colony forming unit-erythroid*). Die CFU-E differenzieren sich daraufhin in orthochromatischer Normoblasten (ON), die durch Kernentfernung zu Retikulozyten (RET) und schließlich zu roten Blutkörperchen (RBK) werden (zusammengefasst dargestellt in ^[124], siehe Abbildung 7). Diese reifen Erythrozyten sind bikonkave Scheiben ohne Mitochondrien, Zellkern und andere Organellen, jedoch voll mit Hämoglobin und damit fähig, Sauerstoff zu binden und zu transportieren.

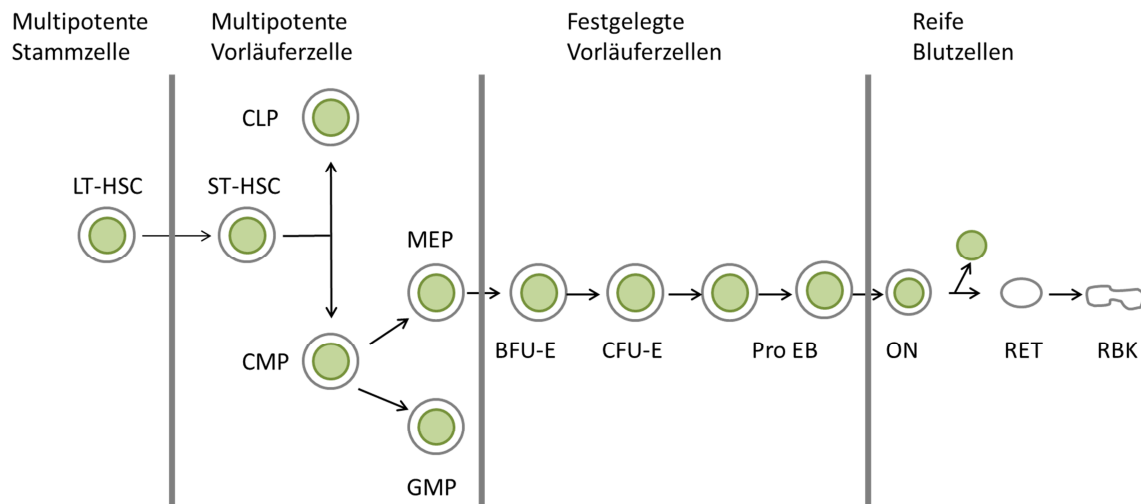


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Erythropoese. Modifiziert nach ^[124]. LT-HSC: *long-term repopulating HSC*; ST-HSC: *short-term repopulating HSC*; CMP: *common myeloid progenitor*; MEP: *megakaryocytic/erythrocytic progenitor*; GMP: *granulocyte-myeloid progenitor*; BFU-E: *Epo responsive erythroid burst forming unit-erythroid*; CFU-E: *colony forming unit-erythroid*; ON: orthochromatischer Normoblasten; RET: Retikulozyten; RBK: Blutkörperchen.

Die Erythropoese benötigt *in vivo* als auch *in vitro* Erythropoetin (Epo) und SCF (*stem cell factor*) Signaling durch ihre Rezeptoren EpoR und c-Kit. Epo fördert die Erythropoese durch die Begünstigung der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von erythrozytären Vorläufern (BFU-E, CFU-E). Die Bindung von Epo an seinen Rezeptor EpoR aktiviert unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden wie Stat5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*), Phosphoinosite-3 Kinase/Akt und MAPK (*Shc/Ras/Mitogen-Activated Kinase*) ^[125, 126]. Die komplexe Entwicklung einer HSC zu reifen roten Blutkörperchen ist eng durch spezifische Transkriptionsfaktoren reguliert ^[127-129]. Diese Transkriptionsfaktoren haben nicht nur die Aufgabe, erythrozytäre Gene zu aktivieren, sie sorgen auch gleichzeitig für die Unterdrückung anderer Differenzierungsrichtungen ^[130, 131]. Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren stellt GATA-1 dar, der sowohl essentielle erythrozytäre Gene aktiviert ^[132, 133] als auch für die Unterdrückung anderer Differenzierungsrichtungen in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen zuständig ist ^[134].

4.3.2 Granulopoese

Die Granulopoese bezeichnet die Bildung reifer neutrophiler Granulozyten aus unreifen Myeloblasten. Die davor stattfindende Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen bis zum Myeloblast wird allgemein als Myelopoese bezeichnet. Dieser Differenzierungsprozess geht einher mit dem Ende der Proliferation und der fortlaufenden Synthese von Enzymen und Proteinen, die die unterschiedlichen Granula innerhalb der Zelle bilden. Dadurch entstehen eine Reihe morphologisch unterschiedlicher Zellen (Abbildung 8), die sich vor allem durch ihre charakteristische Zellkernform und ihrer spezifischen Granula differenzieren lassen.

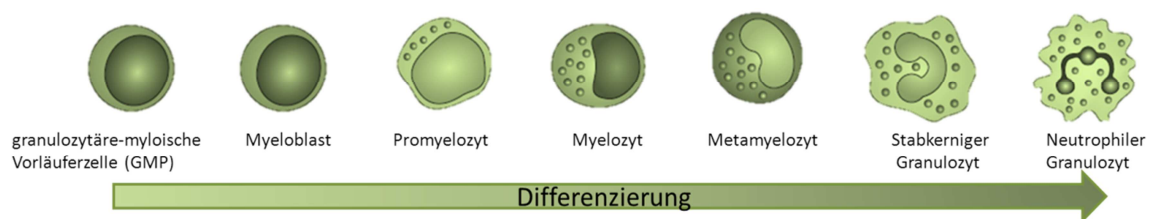


Abbildung 8: Prozess der Granulopoese ausgehend von der granulozytären-myeloischen Vorläuferzelle (GMP). Die Entwicklung der GMPs sind in Abbildung 7 dargestellt. Modifiziert nach ^[135].

Die in den Granula enthaltenen Proteine üben eine antibakterielle und regulierende Funktion aus, nachdem sie von den Zellen freigesetzt wurden. Diese Freisetzung erfolgt normalerweise als Antwort auf eine bakterielle Infektion. Der Prozess der Differenzierung findet im Knochenmark statt. Die reifen Granulozyten werden anschließend ins Blut ausgespült und wandern dann in periphere Gewebe ein, um dort ihre Aufgabe zu erfüllen. Die kurze Lebensspanne von ungefähr 48 h erfordert eine ständige Nachproduktion und ein großes Depot im Knochenmark ^[135]. Die Produktion von Granulozyten ist durch ein enges Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen geregelt. Der G-CSF (*granulocyte colony-stimulation factor*) ist einer der wichtigsten Regulatoren der neutrophilen Granulozytendifferenzierung und sorgt u.a. für die Proliferation, Reifung und funktionelle Aktivierung dieser Differenzierungsrichtung ^[136, 137]. Die Zytokine IL-3 und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) sind ebenfalls essentiell für die Granulopoese ^[138, 139]. Einer der wichtigen Transkriptionsfaktoren ist das C/EBP- α (*CAAT/enhancer binding protein alpha*), der durch die Bindung an Promotorregionen direkt unterschiedliche Granulopoese assoziierte Gene aktiviert ^[140].

4.3.3 Megakaryopoese

Die Megakaryopoese ist ein fortlaufender Prozess der Thrombozytenproduktion. Diese Entwicklung beginnt bei der hämatopoetischen Stammzellen (HSC), über „*high proliferative-potential-cell*“-Megakaryozyten (HPPC-MKs), *burst-forming unit*-MKs (BFU-MKs), *colony-forming unit*-MKs (CFU-MKs), Megakaryoblasten bis hin zu reifen Megakaryozyten, die dann Thrombozyten produzieren (dargestellt in Abbildung 9). Diese Differenzierung geht mit einer Reihe von spezialisierten biologischen und molekularen Prozessen einher, währenddessen es zu einer massiven Umgestaltung des Zytoplasmas kommt. Während der Differenzierung zu Megakaryozyten wird der Zellkern durch Endomitose polyploid ^[141]. Als Endomitose bezeichnet man die Duplikation von DNA ohne nachfolgende Zellteilung. Des Weiteren vermehrt sich das Zytoplasma und sorgt so für eine Zellgröße bis zu 100 µm, diese Zellen weisen eine Polyplodie von 4N-128N auf ^[142, 143].

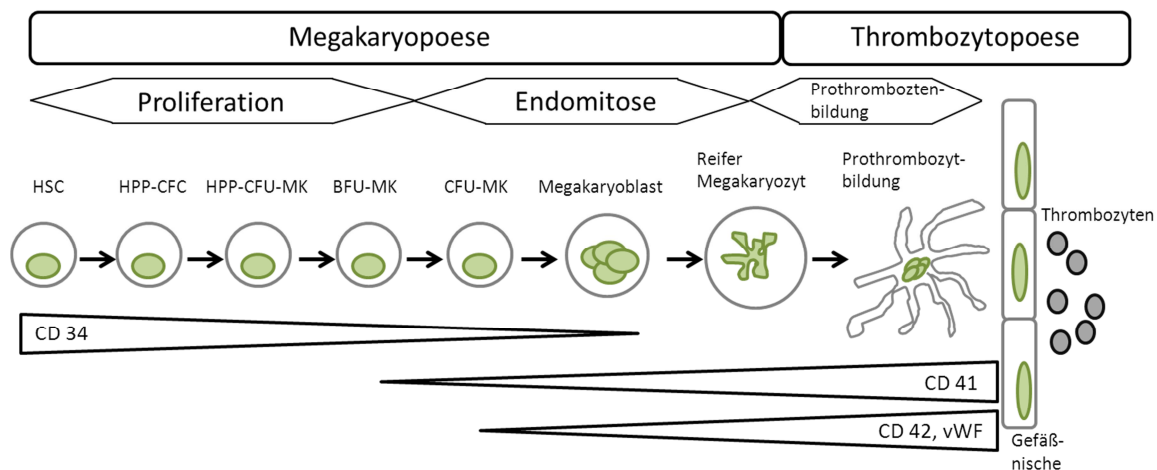


Abbildung 9: Entwicklung von reifen Megakaryozyten (MK, Megakaryopoese) und Thrombozyten (Thrombopoese) aus hHSCs. Zelltypen sind wie folgt abgekürzt: HPPC-CFC, *high proliferative-potential cell-colony-forming cell*; HPP-CFU-MK, *high proliferative-potential colony-forming unit-MK*; BFU-MK, *burst-forming unit-MK*; CFU-MK, *colony-forming unit-MK*. Die Expression der HSC-spezifischen CD34 und MK-spezifischen CD41 und CD42 während der Differenzierung ist dargestellt. Modifiziert nach ^[144].

Während die Zellen an Zytoplasma zunehmen und polyploid werden, werden auch die Organellen und das demarkierende Membransystem vervielfältigt ^[145]. Liegt ein reifer Megakaryozyt vor, so beginnt die Thrombozytopoese mit der Ausbildung von Zytoplasmaausstülpungen, aus denen die Thrombozyten *de novo* gebildet werden ^[146, 147]. Innerhalb dieses Differenzierungsprozesses nimmt die Expression des hHSCS

Markers CD34 kontinuierlich ab, dafür nimmt die Expression der Megakaryozytenmarker CD41 und CD42b zu.

Die Megakaryopoese und Thrombozytenproduktion geschieht innerhalb des komplexen Knochenmarkmilieus. Dort sorgt ein Netzwerk von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen für die Regulation des Differenzierungsprozesses ^[148]. Thrombopoetin (TPO) ist hierbei der hauptsächliche physiologische Regulator der Megakaryopoese, dieses Zytokin ist zum Großteil alleine für die Stimulierung der Proliferation und Differenzierung von Megakaryozentvorläuferzellen verantwortlich ^[149-152]. Der TPO-Signalweg führt über die Janus-Kinasen-Familie (JAK) zur Regulation von Downstream Signalwegen wie z.B. STAT (*signal transducer activators of transcription*) der MAPK (*Ras/Raf-1/mitogen-activated protein kinase*). Wie alle Differenzierungsprozesse ist auch dieser durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren reguliert. Bekannt ist, dass das Zinkfinger-Protein GATA-1 die Expression vieler Megakaryopoese-spezifischen Gene steuert ^[153] und einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren innerhalb dieser Differenzierung darstellt, indem er Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren wie FOG (*friend of GATA*) formt. Daneben sind auch noch andere Transkriptionsfaktoren in die Entwicklung von Thrombozyten involviert. Fli-1 ist ein essentieller Regulator der frühen und mittleren Entwicklungsstadien, während NF-E2 die späten Stadien sowie die Thrombozytenproduktion kontrolliert ^[154-157]. Insgesamt jedoch sind die molekularen Mechanismen der Megakaryopoese noch wenig untersucht.

4.3.4 Therapeutische Anwendung

Schon seit 1959 werden hHSCs in Form von Knochenmarktransplantationen in der Behandlung von Blutkrebsformen eingesetzt ^[9, 10]. Heute werden Knochenmarkstransplantationen entweder bei der Behandlung von Blut- (Leukämien oder Lymphome) und Lymphdrüsenkrebs eingesetzt oder bei der Behandlung von nicht-hämatopoetischen Krebsarten, die mit einer hochdosierten Chemotherapie behandelt werden. Andere Indikationen für die Anwendung einer Knochenmarkstransplantation

stellen genetische oder erworbene Knochenmarksdefekte dar (z.B. Sichelzellenanämie, aplastische Anämie) und seit einiger Zeit auch Autoimmunkrankheiten^[158].

5 Nanopartikel in biologischen Systemen

Die Interaktion von Nanopartikeln in biologischen Systemen mit Zellen eröffnet den Weg zur Erforschung neuer medizinischer Behandlungsmethoden^[159]. Um diesen Ansatz verstehen zu können, ist es wichtig, zunächst den Begriff Nanotechnologie zu beschreiben. Die *US National Nanotechnology Initiative* definierte den Begriff Nanotechnologie im Jahr 2000 folgendermaßen:

„Nanotechnologie befasst sich mit Materialien und Systemen, deren Struktur und Komponenten neuartige und signifikant verbesserte physikalische, chemische und biologische Eigenschaften sowie Phänomene und Prozesse aufweisen, die durch ihre nanoskalige Größe bedingt ist.“^[160]

Nanopartikel stellen also ultrakleine Teilchen im Bereich von wenigen nm bis zu einigen hundert nm dar, die die Eigenschaften von Festkörpern (z.B. Fluoreszenz wie im Falle von Quanten-Punkte) mit der Fähigkeit sich zu bewegen (eine Eigenschaft von Molekülen) verbinden^[161-166]. Diese Nanopartikel (NP) haben in den letzten Jahren den Sprung aus der Forschung in die industrielle Nutzung gefunden, so werden sie z.B. im Bereich Elektronik und Kommunikation, in optischen Systemen, in der Chemie und auch in der Biologie eingesetzt^[167]. Der Begriff Nanomedizin beschreibt den Einsatz von Nanopartikeln für therapeutische Zwecke und verspricht, medizinische Behandlungen und Therapien im Bereich Bildgebung, schnellere Diagnostik, Wirkstoffgaben und die Entwicklung neuer medizinischer Produkte zu revolutionieren. Zum heutigen Zeitpunkt befinden sich schon zahlreiche nanotechnologische Anwendungen in vorklinischen oder klinischen Studien oder sind sogar schon für den medizinischen Gebrauch zugelassen (zusammengefasst in^[168]).

Der Einsatz von Nanomaterialen und Nanopartikeln in Biologie, Pharmazie und Medizin stellt jedoch einige Anforderungen an die zu entwickelnden Materialien:

- Nanomaterial und NP sollten mit Zellen und Proteinen interagieren können, jedoch ohne ihre biologische Aktivität zu verändern oder zu stören, bzw. sie nur in einer gewünschten Art verändern.
- Die für NP und andere Nanomaterialien herausragenden physikalischen Eigenschaften müssen auch nach einer Oberflächenmodifikation noch vorhanden sein.
- Nanomaterialien und NP dürfen nicht toxisch sein.

Das folgende Kapitel soll den aktuellen Entwicklungsstand solcher für die medizinische und biologische Anwendung konzipierter Nanopartikel darstellen, ihre Vielfalt hinsichtlich Material als auch Anwendungen aufzeigen und dann im Besonderen auf die Interaktion dieser Nanopartikel mit Stammzellen eingehen.

Nanopartikel lassen sich in zwei große Kategorien unterteilen: anorganische und organische Nanopartikel. In beiden Fällen handelt es sich um Partikel, die einzigartige größenabhängige physikalische und chemische Eigenschaften, wie z.B. optische, magnetische, katalytische, thermodynamische oder elektrochemische Eigenschaften aufweisen. Diese speziellen Eigenschaften werden auch durch die chemische Zusammensetzung und ihrer Form beeinflusst. Zu den anorganischen Nanopartikeln zählen zum Beispiel Quanten-Punkte, Silber- und Goldpartikel.

Organische Nanopartikel werden aus organischen Polymeren hergestellt, zu ihnen zählen unter anderem Liposomen, Dendrimere und Kohlenstoffnanoröhren. Polymere NP zeigen (abhängig von jeweiligen Material) im Gegensatz zu anorganischen NP eine bessere Biokompatibilität, herausragende Eigenschaften als Wirkstoffträger und eine große Vielfältigkeit im Bereich der klinischen Nutzung. Eine Vielzahl von Produkten wurde schon patentiert und befinden sich in unterschiedlichen Stadien der klinischen Zulassung ^[169, 170].

Eine Möglichkeit, polymere Nanopartikel zu erhalten, stellt der Miniemulsionsprozess dar. Da in dieser Arbeit die Biokompatibilität von Partikeln untersucht wurde, die mit

diesem Prozess hergestellt worden sind, werden im Folgenden die Grundzüge dieser Methode erläutert.

Das Prinzip der Miniemulsionstechnik wurde 1973 erstmals von Ugelstad et al. publiziert.^[171] Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Partikel mit einem Durchmesser zwischen 50 und 500 nm herstellen^[172]. Eine Miniemulsion wird aus zwei miteinander nicht mischbaren Phasen hergestellt, einer kontinuierlichen Phase und einer dispersen Phase. In der lipophilen dispersen Phase befindet sich bei einer direkten Miniemulsion das Monomer, ein Initiator, Stoffe wie z.B. Farbstoffe, die einpolymerisiert werden sollen, und ein Ultrahydrophob. Die wässrige kontinuierliche Phase enthält ein Tensid, welches die Stabilisierung der Partikel gewährleistet. Durch Menge und Art des Tensides (ionisch oder nicht-ionisch) wird auch die Größe der Partikel bestimmt: je mehr Tensid, desto kleiner werden in der Regel die Partikel. Dieses System wird zunächst durch starkes Rühren voremulgiert und anschließend mit Ultraschall behandelt. Durch Kavitation an der Ultraschallspitze werden starke Scherkräfte erzeugt, die die dispergierten Tröpfchen zerkleinern. Durch die Ultraschallbehandlung wird eine optimale Durchmischung der dispersen Phase und damit eine einheitliche Tropfengröße erzielt. Während dieses Prozesses wirkt das Ultrahydrophob der dispersen Phase der Ostwald-Reifung entgegen, indem es innerhalb der Tröpfchen einen osmotischen Druck aufbaut. Nach der Ultraschallbehandlung erhält man ein sehr stabiles System, in dem sich die Tröpfchengröße nicht mehr ändert und auch während der Polymerisation gleich bleibt^[173].

5.1 Nanomedizin – Anwendung von NP im klinischen Bereich

Der Neologismus „Nanomedizin“ tauchte Ende des letzten Jahrhunderts in der wissenschaftlichen Literatur auf und bezieht sich auf die Verwendung von Nanotechnologie für die menschliche Gesundheit^[2]. Seitdem hat die Entdeckung und Entwicklung von neuen Wirkstoffen, Implantaten und Geräte, die auf nanoskaligen Materialien basieren, zu einer kompletten Neugestaltung auf diesem Gebiet geführt. Dies zeigt sich auch an der Zahl der vorklinischen und klinischen Studien in diesem Bereich,

die Ende 2009 bei fast 600 lagen (nach Angaben des National Institutes of Health, USA, <http://www.clinicaltrials.gov>).

Im Folgenden soll auf die einzelnen Einsatzgebiete der Nanomedizin näher eingegangen werden, wobei der Fokus auf der Verbindung von Nanopartikeln und Stammzellen liegt (siehe auch Kapitel 4.2.4).

Abbildung 10 zeigt mögliche Verwendungen von Nanopartikeln und Stammzellen, die sich die spezifischen Stammeigenschaften zu Nutze machen.

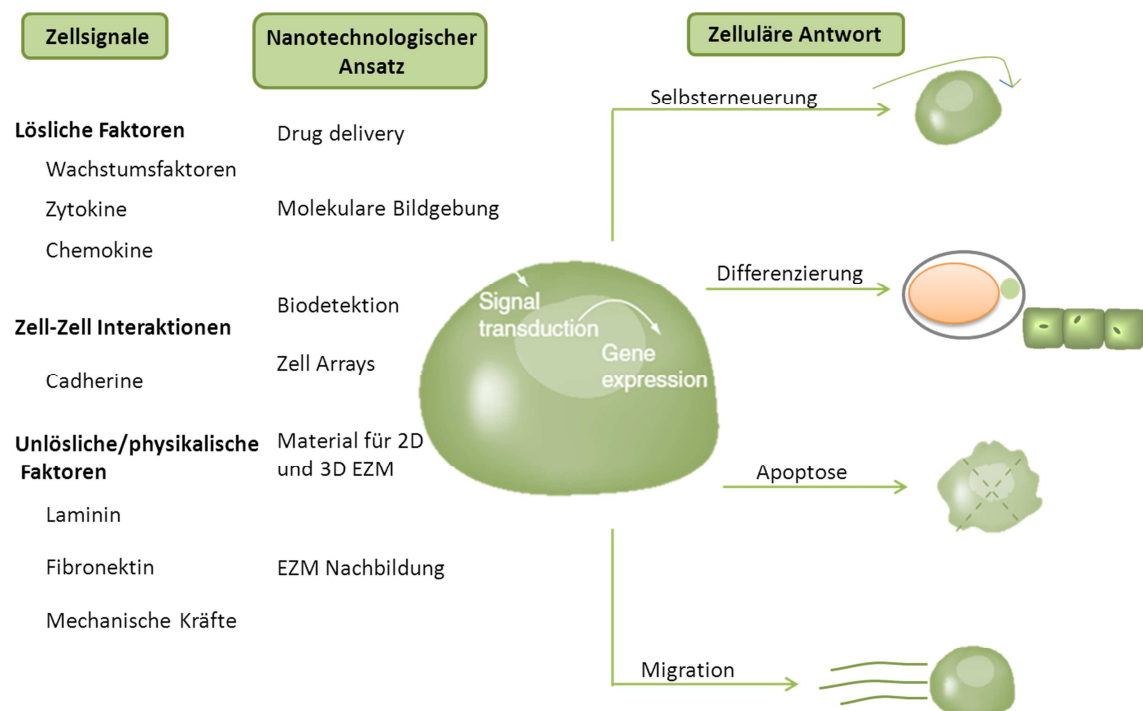


Abbildung 10: Potenzielle Anwendungen der Nanotechnologie im Bereich der Stammzellforschung. EMZ: Extrazelluläre Matrix. Modifiziert nach ^[174].

5.1.1 Markierung von Stammzellen für die medizinische Bildgebung

Transplantierte Stammzellen werden im Tiermodell normalerweise mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden detektiert, nachdem Gewebe oder ganze Organe dem Tier entnommen wurden. Für vorklinische und klinische Studien am Menschen ist dieses Vorgehen meist nur in begrenztem Umfang möglich. Es ist bei diesen Studien jedoch von großer Bedeutung, den therapeutischen Effekt und die Stelle der

Einwanderung der Zellen zu bestimmen, um Hinweise auf eventuelle gefährliche Nebenwirkungen zu entdecken. Die Magnetresonanztomographie (MRT) bietet eine nichtinvasive Methode um transplantierte Stammzellen im Körper zu verfolgen. Hierzu wurden die Stammzellen hauptsächlich mit supraparamagnetischen Eisenoxiden (superparamagnetic iron oxide, SPION) markiert. SPIONS existieren in unterschiedlichen FDA (U.S Food and Administration)-zugelassenen Formulierungen (Feridex[®], Endorem[®]). Eine klinische Studie, in der SPION markierte Stammzellen zur Behandlung eines Patienten mit einer neurologischen Erkrankung verwendet wurden, wurde 2006 publiziert ^[175]. Die Markierung von hMSCs und hHSCs ist in der wissenschaftlichen Welt weit verbreitet, wobei es sich bei den meisten Veröffentlichungen um *in vitro* Versuche handelt. hHSCs wurden in den Arbeiten von Maxwell et al., Arbab et al. und Janic et al. erfolgreich mit unterschiedlichen Konzentrationen an Feridex[®] markiert, wobei keiner der Forscher eine Beeinträchtigung der Zellfunktionen feststellen konnte ^[176-178]. Auch die Markierung von hMSCs mit unterschiedlichen SPIONS wurde schon sehr häufig publiziert, wobei es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses auf die Differenzierungsfähigkeit gibt. Eine Vielzahl der Forscher konnte keine Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials entdecken ^[179], während andere eine Änderung in manchen Differenzierungsrichtungen feststellen konnten. Eine Weiterführung dieser Versuche gestaltet sich jedoch sehr schwierig, da sowohl Feridex[®] als auch Endorem[®] momentan nicht mehr auf dem freien Markt erhältlich sind.

Auch Quanten-Punkte werden zur Langzeitmarkierung von Stammzellen verwendet. Das diskrete Emissionsspektrum und breite Anregungsspektrum bietet die Möglichkeit, mehrere Zellfunktionen oder Zellpopulationen gleichzeitig zu verfolgen ^[180]. *In vivo* Tracking von mit Quanten-Punkten markierten Zellen benötigt einen speziellen Tierimager. Die passive Markierung von hMSCs mit Quanten-Punkte führt zu einer Markierung des Zytoplasmas. Diese so markierten Zellen zeigten *in vitro* ein unverändertes Verhalten für mindestens 6 Wochen, *in vivo* sogar für 8 Wochen ^[181]. Diese markierten Zellen akkumulierten nach einer intravenösen Injektion in NOD/SCID-Mäuse nach 24 h in der Lunge, der Leber und der Milz, jedoch nicht in Gehirn, Herz oder Niere ^[182]. Ein Problem der Verwendung von Quanten-Punkten in biologischen Systemen ist jedoch durch ihre hohe Toxizität bedingt. Die Kernsubstanz eines Großteils der

Quanten-Punkte besteht aus Cadmium oder Selen. In Zellen werden diese Ionen in die Kalziumkanäle aufgenommen und akkumulieren dort ^[183, 184]. Cadmium inhibiert die DNA-, RNA- und Proteinsynthese und verursacht DNA Strangbrüche und Genmutationen ^[185, 186]. Die toxischen Ionen werden von der Oberfläche der Quanten-Punkten abgegeben, wenn diese oxidiert wird.

5.1.2 Drug delivery/Gentherapie

Genetisches Material kann mit Hilfe von viralen und nicht-viralen Trägern in Zellen eingebracht werden, wobei nicht-virale Träger für eine medizinische Anwendung deutlich sicherer sind. NP können effektive Vektoren für einen solchen Gentransfer darstellen. Apatit-NP, die elektrostatisch mit Fibronectin und E-Cadherin beschichtet waren, wurden 2006 als effizientes „Gene delivery“-System für embryonale Stammzellen beschrieben ^[187]. Hierbei war die beobachtete Transfektionseffizienz 3-mal höher als die durch das kommerziell erhältliche Transfektionsagens LipofektaminTM 2000 ^[187, 188].

Die Möglichkeit, Biomoleküle wie Proteine, Wachstumsfaktoren und kleine Signalmoleküle über eine bestimmte intrazelluläre Route in Zellen einzubringen, stellt eine sehr gute Methode dar, um die Differenzierung von Stammzellen zu kontrollieren. Dies ist in manchen medizinischen Anwendungen wie z.B. bei der Therapie von großen Knochendefekten sehr wünschenswert. Ausgewählte Biomoleküle können in bioabbaubare und biokompatible NP verpackt werden, um dann nach einer erfolgreichen Zellaufnahme im Zytoplasma wieder freigesetzt zu werden. Dies wurde z.B. bei hESCs (humanen embryonale Stammzellen) und polymeren NP, die den vaskulären Wachstumsfaktor enthielten, getestet ^[189]. Hierbei zeigten die Partikel keinen Einfluss auf die Zellviabilität und Proliferation, jedoch einen großen Effekt auf die Differenzierung.

Das gleiche Prinzip wird auch für die Verpackung und gezielte Applikation von medizinischen Wirkstoffen verwendet. Hierbei ist der Hintergedanke, Nebenwirkungen zu reduzieren, indem die Wirkstoffe erst an oder in der Zielzelle freigesetzt werden. Dieser Ansatz eröffnet auch neue Applikationsmethoden für einige Wirkstoffe, so könnte eine orale Gabe von Insulin oder Heparin möglich sein ^[190, 191] oder auch eine Gabe über

die Haut ^[192, 193]. Auch sensitive Materialien wie Proteine ^[194] oder siRNA ^[195] können so geschützt bis zu ihrem vorhergesehen Wirkort gelangen.

5.2 Interaktion von Nanopartikeln und (Stamm) Zellen

Alle im Kapitel 5.1 angesprochenen Einsatzmöglichkeiten von NP setzen die Aufnahme unterschiedlichster NP in Zellen voraus. Die daraus resultierende Beladung der Zellen mit NP sollte je nach Anwendung auch entsprechend hoch ausfallen, ohne jedoch die Zellhämöostase zu stören. Die Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen wird durch Partikeleigenschaften wie Größe, Form, Material, Oberflächenladung, Oberflächenfunktionalisierung und Hydrophobizität beeinflusst. Diese Eigenschaften können sowohl die Partikelaufnahme also auch die Bindung von Proteinen an der Partikeloberfläche sowie die intrazelluläre Translokation beeinflussen ^[196, 197].

Die Größe und die Größenverteilung von NP bestimmen mit über die Interaktion der Partikel mit der Zellmembran und die Durchquerung dieser physiologischen Barriere. Hierbei ist zu bedenken, dass für unterschiedliche biologische Grenzflächen unterschiedliche optimale Partikelgrößen gelten, die vom Gewebe, dem Zielort und der Zirkulation der Partikel abhängen. Andere Eigenschaften der Partikeloberfläche wie Form und Radius der Krümmung beeinflussen ebenfalls die Zellaufnahme ^[198-200]. Für Stammzellen konnte nachgewiesen werden, dass sie Partikel im Bereich von einigen Nanometern (z.B. Quanten-Punkte) bis hin zu 1 μm aufnehmen können ^[201]. Generell werden Nanopartikel besser von Zellen aufgenommen als Mikropartikel. So zeigen 100 nm Partikel eine deutlich höhere Aufnahme in Caco-2-Zellen als 1 μm große Partikel ^[202]. Auch die Form der Partikel kann einen wesentlichen Einfluss auf die Aufnahme haben. In einer Studie mit proteinbeladene Goldpartikel konnte für die Zelllinien HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen), SNB19 (Gehirntumorzellen) und STO (Fibroblasten) nachgewiesen werden, dass runde NP deutlich besser aufgenommen werden als Stäbchen ^[200, 203]. Die Form beeinflusst nicht nur die Menge an aufgenommenen Partikeln, sondern auch den Aufnahmemechanismus und die Geschwindigkeit der

Aufnahme. So werden runde Partikel von Endothelzellen schneller aufgenommen als ellipsenförmige Partikel^[204].

Unspezifische Kräfte, die den Partikel-Zellkontakt und die Partikelaufnahme fördern, ergeben sich aus den intrinsischen Eigenschaften der verwendeten Partikel (Oberflächenladung, Hydrophobizität und Rauheit). Die Oberflächenladung spielt eine wichtige Rolle bei der Partikelinteraktion mit geladenen Phospholipid-Kopfgruppen oder Proteindomänen auf der Zelloberfläche^[205].

Auch wirken sich unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen mit funktionellen Gruppen oder die Ladung an der Oberfläche auf die Aufnahme der Partikel aus. Hierbei zeigt sich, dass die Hydrophobizität oder Hydrophilität der Oberfläche die Partikel-Zelladhäsion während des Aufnahmeprozesses beeinflusst. Einige Gruppen zeigen, dass mit einer ansteigenden Hydrophobizität des Polymers die Anheftung an die Zelle und die darauf folgende Aufnahme gesteigert wird^[206].

Die meisten geladenen Gruppen sind für eine aktive Interaktion von Partikeln mit Zellen verantwortlich^[207]. Hierbei zeigt sich jedoch, dass positive und negative Oberflächenladungen zu unterschiedlichen Aufnahmewegen in die Zelle führen. Hierbei wird vermutet, dass die Aufnahme negativ geladener NP über eine nicht-spezifische Bindung und einer Zusammenlagerung der Partikel auf positiv geladenen Stellen der Plasmamembran stattfindet und dadurch die Endozytose der Partikel eingeleitet wird. Bei positiv geladenen Partikeln ist bekannt, dass sie an negativ geladenen Gruppen an der Zelloberfläche binden^[208]. Auch zeigt sich, dass positiv geladene Partikel deutlich besser aufgenommen werden als negativ geladene, wobei insgesamt die Aufnahme geladener Partikel besser ist als die ungeladener Partikel. Für carboxy- und aminofunktionalisierte Polystyrol-Partikel wurde gezeigt, dass diese Funktionalisierungen in unterschiedlichen Zelllinien (HeLa, hMSC, Jurkat, KG1a) zu einer deutlich verbesserten Aufnahme führte, wobei die Gruppendichte einen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme in unterschiedlichen Zelllinien hat. Hierbei gilt für die carboxy-funktionalisierten Partikel, dass die Aufnahme sowohl in HeLa-Zellen und hMSCs nur bis zu einer gewissen Gruppendichte gesteigert werden kann, bei noch höherer Gruppendichte auf der Oberfläche nimmt die Zellaufnahme wieder ab^[209, 210]. Bei

aminofunktionalisierten Polystyrol-Partikeln verhält es sich für hMSCs analog ^[211], für HeLa-Zellen nimmt die Aufnahme stetig mit steigender Funktionalisierung zu ^[211].

In Abhängigkeit der Partikelladung ist auch das Absorptionsverhalten von Serumproteinen aus dem Medium unterschiedlich, das kann zu einer erhöhten oder erniedrigten Partikelaufnahme führen. Generell spielt die sogenannte Protein Corona eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Partikeln und Zellen. Sobald Nanopartikel mit einem biologischen System/Flüssigkeit in Kontakt kommen, werden sie mit Proteinen überzogen. Hierbei können die Proteine einer Konformationsänderung unterlaufen, neue Epitope präsentieren, ihre Funktion ändern oder ihre Avidität verändern ^[212-214].

In enger Verbindung zur Oberflächenbeschaffenheit der NP steht auch das verwendete Material. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein Polystyrol-/Polyisoprengemisch im Gegensatz zu reinem Polystyrol-Partikel besser von HeLa- und Jurkat-Zellen aufgenommen wird ^[215].

Die Aufnahme von NP in zelluläre Systeme erfolgt über unterschiedliche Endozytosewege. Welcher der zur Verfügung stehenden Endozytosewege von dem jeweiligen Nanopartikel verwendet wird, hängt von den oben beschriebenen Faktoren wie Größe, Ladung, Material und Form ab.

Doch trotz vieler Fortschritte innerhalb der Nanotechnologie und der Schnittstelle von Biologie und Nanotechnologie, gibt es über das Schicksal und der Funktion von Partikel innerhalb der Zelle nur wenige Erkenntnisse, die auch noch schwer miteinander zu vergleichen sind. Bekannt ist, dass wenn Partikel einmal aufgenommen wurden, sie hauptsächlich in Endosomen und Lysosomen zu finden sind. Diese Organellen verfügen über einen niedrigen pH-Wert und Lysosomen enthalten Proteasen und andere Enzyme, die eine Vielzahl von biologischen Substanzen abbauen können.

Die Ansammlung von Nanopartikeln in Endosomen von Stammzellen lässt auch Raum für Diskussionen über den Einfluss dieser NP auf das endosomale Signaling. Die Arbeit an unterschiedlichen Zellsystemen unterstützt die These, dass endosomale Organellen eine direkte Rolle in der Signalverarbeitung und Signalverstärkung haben ^[216].

Die Erforschung der Partikel-Zellinteraktionen wird auch in den nächsten Jahren Gegenstand der Wissenschaft sein, da bisherigen Erkenntnisse nur einem Flickenteppich gleichen. Insgesamt ist es jedoch schwierig, die Erkenntnisse der Literatur miteinander zu vergleichen, da meist jede Gruppe ein anderes Partikelsystem verwendet und so viele unterschiedliche Parameter einen Einfluss auf die Interaktion, Aufnahme und Toxizität der Zellen haben. Weiterhin zu bedenken ist, dass der Einfluss der oben beschriebenen Parameter sich auf unterschiedliche Zelllinien, aber auch auf gleiche Zellen in unterschiedlichen physiologischen Zuständen (Zellzyklusphase, Medienzusammensetzung etc.) unterschiedlich auswirken können.

5.3 Nanotoxikologie

Obwohl der Einsatz von Nanotechnologie in vielen medizinischen Bereichen sehr vielversprechend ist und bereits in der Klinik eingesetzt wird, existieren nur unzureichende Daten über die potentielle Toxizität dieser Materialien. Neben der Suche nach neuen und besseren Materialien für die klinische Anwendung ist es notwendig, die Toxikologie und Pharmakinetik dieser Materialien im gleichen Umfang zu untersuchen.

Während und nachdem ein Partikel in eine Zelle aufgenommen wurde, bestehen zahlreiche Möglichkeiten, wie dieser Partikel zelluläre Funktionen behindern oder fördern kann, so dass das natürliche Gleichgewicht der Zelle gestört ist und mögliche toxische Folgen bis hin zur Apoptose auftreten können. Eine oft beobachtete Reaktion der Zellen nach Aufnahme unterschiedlicher NP ist der Anstieg des oxidativen Stress Niveaus. Für aufgenommene Nanopartikel gibt es mehrere Wege, dies auszulösen (siehe Abbildung 11). Intrazelluläre Partikel können mit Mitochondrien interagieren, ihr komplexes Membransystem beschädigen und so zu einem erhöhten ROS (*reactive oxygen species*)-Niveau oder durch Freisetzung von Cytochrom-c zur Apoptose führen^[167]. Dieses erhöhte ROS-Niveau führt zu weitreichenden Konsequenzen. Das oxidative Stress System der Zelle versucht diesem entgegenzuwirken und beginnt mit einer Überexpression antioxidativer Enzyme. Diese können jedoch nur in einem gewissen Maß das ROS-Level kontrollieren. Ist dies zu hoch, führt der oxidative Stress in der ganzen

Zelle zu Schäden wie einer entzündlichen Reaktion, Lipidperoxidation und Zellkern- sowie DNA-Schäden^[167].

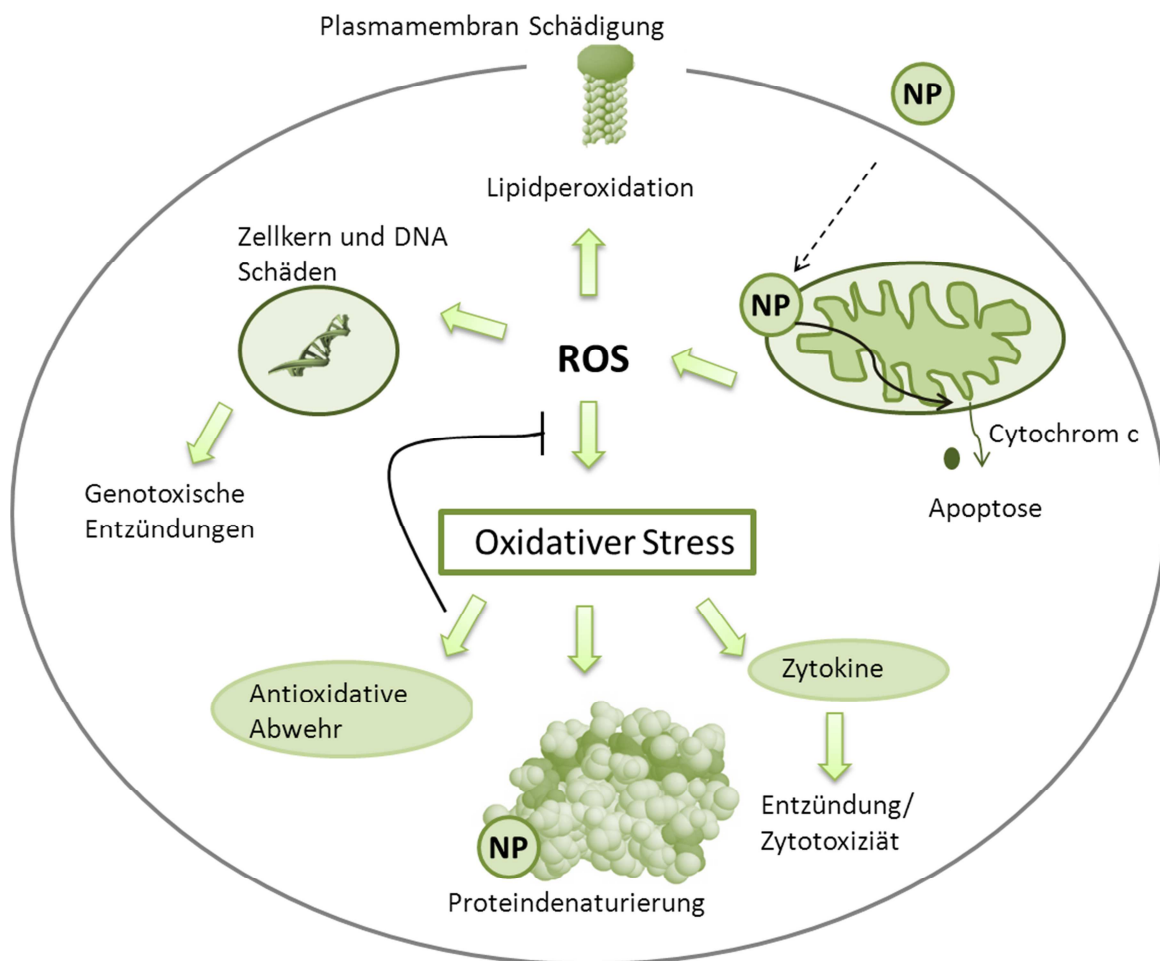


Abbildung 11: Mögliche durch ROS vermittelte Mechanismen, die mit einer durch Nanopartikel hervorgerufenen Toxizität zusammenhängen. NP sind in der Lage direkt mit Mitochondrien zu interagieren, was zur Beschädigung dieser und dadurch zur ROS Produktion führen kann. Um dieses hohe ROS Niveau zu kontrollieren, wird durch den oxidativen Stress Mechanismus die Überexpression von antioxidativen Enzymen induziert. Bei einem sehr hohen Niveau von oxidativem Stress ist dieser Bekämpfungsmechanismus überfordert, was dann zu einer entzündlichen und zytotoxischen Antwort führt. Oxidativer Stress kann in der gesamten Zelle Schäden wie Lipid-Peroxidation, Proteindenaturierung, Zellkern- und DNA-Schäden sowie eine Immunreaktivität hervorrufen. Modifiziert nach ^[167].

Des Weiteren können internalisierte Partikel mit den in der Zelle vorkommenden Proteinen interagieren und zu einer Proteindegradation oder einer Konformationsänderung führen. Somit kann es zu erheblichen Funktionsstörungen der Zelle kommen.

Auch das intrazelluläre Trafficking kann durch die Anwesenheit von NP gestört werden. Dies wurde kürzlich an drei unterschiedlichen Zelllinien untersucht, die mit Quanten-Punkten beladen wurden ^[217]. Die Quanten-Punkte wurden vor der Zellinkubation mit

drei unterschiedlichen Proteinen, die an unterschiedliche Rezeptoren binden, markiert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich der intrazelluläre Transport nach Aufnahme dieser Quanten-Punkte signifikant änderte. Für unterschiedlich geformte mesoporöse Silikapartikel wurde berichtet, dass sie die Zellfunktionen wie Migrationsverhalten und die Zytoskelettorganisation unterschiedlich beeinflussen ^[218].

6 Methoden

6.1 Homogeneous time resolved fluorescence (HTRF®)

Fluoreszenzmessungen in zellbasierten Systemen sind auf Grund der Fluoreszenzeigenschaften der biologischen Komponenten wie Proteine, Mediumbestandteile etc. in ihrer Sensitivität limitiert. Im Allgemeinen ist diese Fluoreszenz der biologischen Komponenten jedoch nur kurzlebig. Diesen Umstand verwendet die HTRF®-Technik um sensitive Fluoreszenzmessungen in biologischen Systemen zu ermöglichen, indem sie langlebige Fluorophore für die Analyse verwendet. HTRF® stellt hierbei eine Messmethode dar, die den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) mit einer zeitauflösenden Fluoreszenzmessung kombiniert. Ein Zeitunterschied von 50-150 μs zwischen der Anregung und der Fluoreszenzmessung ermöglicht eine nahezu komplette Eliminierung der kurzlebigen unspezifischen Fluoreszenzsignale (vergleiche Abbildung 12).

FRET bezeichnet einen Energietransfer von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül, wobei beide ein Fluorophor mit unterschiedlicher Anregungswellenlänge darstellen. Der Energietransfer zwischen diesen beiden Molekülen kann jedoch nur stattfinden, wenn sich beide in räumlicher Nähe (0,5-10 nm abhängig vom Fluorophor) zueinander befinden. Dies wird in der Zellbiologie ausgenutzt, um die Interaktion unterschiedlicher Moleküle zu untersuchen oder bestimmte Moleküle zu quantifizieren. Die Detektion des gewünschten Moleküls erfolgt über zwei mit dem Donor bzw. Akzeptorfluorophor markierten Antikörper, die unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen und nur dann zu FRET fähig sind, wenn beide an das zu analysierende Molekül gebunden sind. Die HTRF®-Technologie verwendet als Donorfluorophor ein Europium-Kryptat und als Akzeptor XL665, ein Phycobilliprotein aus roten Algen.

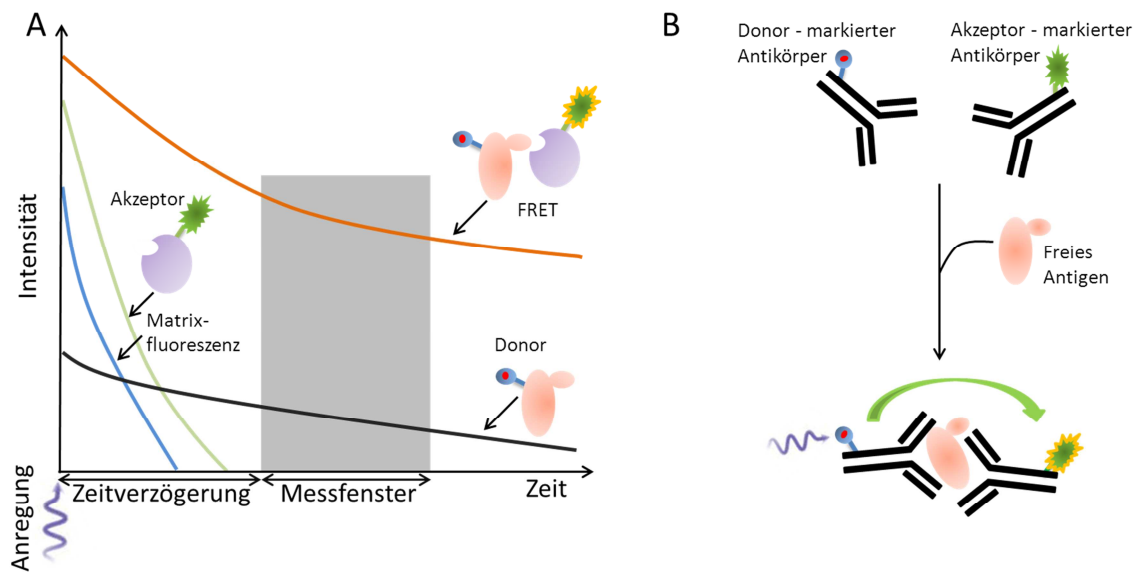


Abbildung 12: A: Funktions- und Messprinzip der HTRF®-Technologie. Nach der Anregung mit einer geeigneten Energiequelle werden die Fluoreszenzsignale erst nach einer Zeitverzögerung gemessen, dies erlaubt eine Messung des gewünschten FRET-Signals (orange Linie) ohne die störenden Fluoreszenzsignale der Matrix (blaue Linie) und des Akzeptor (grüne Linie). B: Schematische Darstellung des Sandwich HTRF Assays. Modifiziert nach ^[219].

Der Vorteil des HTRF®-Assays im Gegensatz zu anderen immunologischen Methoden wie dem klassischen ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zeigt sich in der deutlich einfacheren Handhabung ohne Waschschriffe und vor allem in der Möglichkeit, Unterschiede zwischen einzelnen Messungen, die auf Grund unterschiedlicher Fluoreszenzeigenschaften des Inhalts (Medium, Puffer etc.) entstehen, mit Hilfe einer eleganten Methode zu eliminieren. Hierbei werden zwei Emissionen (Donor und Akzeptor) gemessen und in Relation gesetzt. Die Donoremission wird hierbei als interne Referenz zwischen den einzelnen Messungen verwendet, während die Akzeptoremission als Indikator für die gemessenen biologischen Analyten dient. Da beide Fluoreszenzsignale gleichermaßen von den oben genannten Störfaktoren beeinflusst werden, bleibt das Verhältnis der beiden unverändert. Dies gewährleistet eine stabilere und sensitivere Messung biologischer Analyten, als es bei anderen Methoden wie dem ELISA der Fall ist.

6.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher physikalischer Zellparameter großer Probenmengen in relativ kurzer Zeit, indem die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl durchqueren (vergleiche Abbildung 13). Als Screening-Methode für den Nachweis von Partikelaufnahme und Toxizität in Zellen ist deshalb die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl.

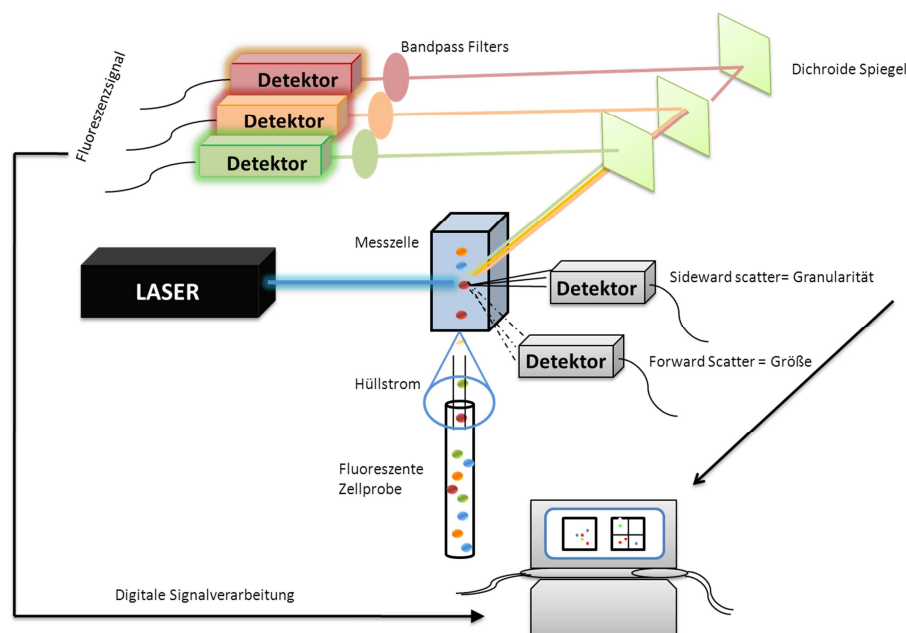


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometrie. Die zu analysierende Probe wird mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms hydrodynamisch fokussiert und durch einen Laserstrahl geleitet. Das dabei entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe eines Systems aus dichroitischen Spiegeln und optischen Filtern zu Detektoren geleitet, dort in elektronische Signale umgewandelt, um mit Hilfe einer Software analysiert zu werden.

Das Funktionsprinzip beruht auf der Erzeugung eines laminaren Stroms, der die Probe (Zellen) vor dem Durchqueren eines Laserstrahls hydrodynamisch fokussiert und die Objekte einzeln den Laser durchqueren lässt. Beim Passieren des Laserstrahls wird das durch die Probe verursachte Streulicht mit Hilfe des optischen Systems auf unterschiedliche Detektoren geleitet. Die Vorwärtsstreuung (*forward scatter* FSC, gemessen bei 20°) des Laserlichts korreliert hierbei mit der Größe der einzelnen Zellen, die Seitwärtsstreuung (*sideward scatter* SSC, gemessen bei 90°) mit der Granularität der Zelle. Trägt die zu analysierende Zelle auch fluoreszierende Komponenten in oder an sich (aufgenommene fluoreszenzmarkierte NP oder fluoreszenzmarkierte Antikörper), die von der gewählten Laserwellenlänge angeregt werden, so wird das entstehende

Fluoreszenzlicht ebenfalls zu den entsprechenden Detektoren geleitet. Hierbei sorgt ein System von dichroitischen Spiegeln und optischen Filtern dafür, dass immer nur bestimmte Wellenlängenbereiche auf einen Detektor treffen. Somit ist gewährleistet, dass mehrere unterschiedliche Eigenschaften einer Zelle auf einmal untersucht werden können. Bei den Detektoren handelt es sich um Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier* PMTs), die die aus Photonen bestehenden Lichtsignale in elektronische Signale umwandeln und gleichzeitig um ein Vielfaches verstärken. Diese elektronischen Signale können mit Hilfe spezieller Software am Computer je nach Anforderung der Messung analysiert werden. Da die zu analysierenden Zellen den Laser einzeln passiert haben, kann jedem Ereignis (Zelle oder Verunreinigung) das nur von ihm erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht zugeordnet und entsprechend ausgewertet werden.

Auch wenn sich diese Methode hervorragend zu großangelegten Nanopartikelaufnahmestudien eignet, gilt es doch zu beachten, dass keine Informationen über die zelluläre Lokalisation der Partikel erlangt werden können. Zur Abklärung dieser Fragestellung (intrazelluläre Lokalisation, tatsächliche Aufnahme der Partikel oder nur äußerliche Anhaftung) muss stets eine mikroskopische Analyse z.B. mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops erfolgen (siehe 6.3).

6.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, cLSM)

Fluoreszenzmikroskopische Analysen sind von großer Wichtigkeit in zellbiologischen Fragestellungen, da sie Live-Bilder der Vorgänge des Zellinneren von lebendigen Zellen liefern. Der Vorteil konfokaler Mikroskopie (cLSM) gegenüber konventioneller Mikroskopie liegt in der unterschiedlichen Bildgenerierung. Während bei der konventionellen Mikroskopie die Objekt-zu-Bild-Transformation für alle Bildpunkte parallel geschieht, werden die Bildpunkte beim cLSM einzeln erzeugt. Die Probe wird in der Fokusebene durch einen fokussierten Laserstrahl in xy-Richtung zeilenweise abgerastert (pixelweise Detektion). Die durch den Laser erzeugte Fluoreszenz wird nun ebenfalls pixelweise von einem Detektor erfasst. Die hierbei vorgeschalteten

Emissionsfilter erlauben eine Analyse unterschiedlicher Wellenlängenbereiche (so können mehrere Farbstoffe in einer Probe verwendet werden). Vor Detektor und Emissionsfilter vorgeschaltet im Strahlengang befindet sich die konfokale Blende, diese sorgt dafür, dass nur Licht aus der Fokusebene an den Detektor gelangen kann (vergleiche Abbildung 14). Somit erzeugt man bei jedem Scan die scharfe Abbildung der jeweiligen Fokusebene ohne Signale aus anderen Ebenen. Wird dies für mehrere Fokusebenen durchgeführt, erlangt man dreidimensionale Informationen über das untersuchte Objekt. Die Detektoren, die die Lichtsignale aufnehmen, sind Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*, PMTs), diese wandeln die Lichtsignale in digitale Signale um, welche dann das Bild generieren.

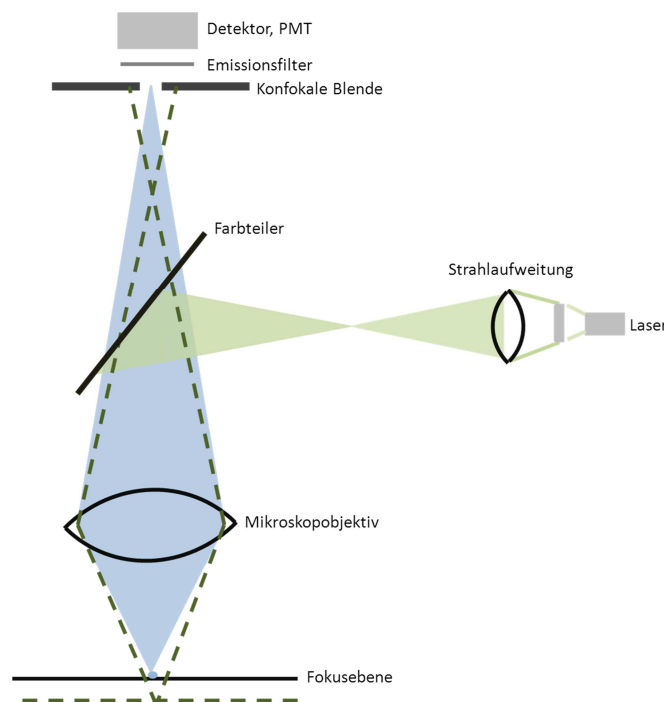


Abbildung 14: Strahlengang in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Mit Hilfe eines über ein Objektiv gebündelten Laserstrahls wird ein in der Probe enthaltener Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird durch das Objektiv gebündelt und an den Detektor weitergeleitet, auf diesem Weg passiert das Licht die konfokale Blende. Diese stellt sicher, dass nur Licht aus der Fokusebene (hellblau) auf den Detektor gelangen kann. Licht aus einer anderen Ebene außerhalb des Fokus (dunkelgrün gestrichelt) gelangt nicht auf den Detektor. Ein vor den Detektor geschalteter Emissionsfilter erlaubt eine selektive Betrachtung ausgewählter Wellenlängen. Modifiziert nach ^[220].

6.4 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)

Die Quantifizierung von mRNA-Level in biologischen Proben ist eine bedeutende Methode, um Auswirkungen unterschiedlicher Behandlungen auf das Zellverhalten zu analysieren. Als „*State of the art*“-Methode gilt hierbei neben den Hochdurchsatzverfahren der Microarrays die quantitative Real-Time-PCR (qPCR). Hierbei wird die PCR-Technik mit einer Echtzeit-Detektion der entstandenen DNA-Menge kombiniert, die dabei entstandenen Signale erlauben eine Quantifizierung der produzierten DNA Menge, welche mit der eingesetzten Menge an cDNA korreliert. Mit Hilfe dieser Ergebnisse lassen sich Aussagen über die Expression bestimmter Gene unter unterschiedlichen Bedingungen treffen. Als Ausgangsmaterial für die qPCR dient RNA, welche aus dem zu untersuchenden Gewebe oder Zellen extrahiert worden ist. Die RNA kann entweder direkt in der PCR-Reaktion in cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkriptase-PCR) oder in einem separaten Schritt. Die so erhaltene cDNA wird in der qPCR Reaktion eingesetzt.

Um eine Quantifizierung der Produkte zu erreichen, stehen unterschiedliche Methoden zur Auswahl. In der vorliegenden Arbeit wurde die SYBR®Green-Methode angewendet, weshalb nur diese hier beschrieben wird. SYBR®Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und grünes Licht emittiert.

Während eines PCR-Zyklus liegt die DNA nach der Denaturierung einzelsträngig vor und keine SYBR®Green-Fluoreszenz ist messbar (siehe Abbildung 15). Sobald die Primer sich an die Einzelstränge anlagern und die Kettenverlängerung beginnt, nimmt der Anteil der doppelsträngigen DNA und somit auch die SYBR®Green-Fluoreszenz zu. qPCR-Maschinen detektieren nach jedem PCR-Zyklus diese Fluoreszenz, so entsteht nach üblicherweise 40 Zyklen eine Fluoreszenz-Zeit-Kurve.

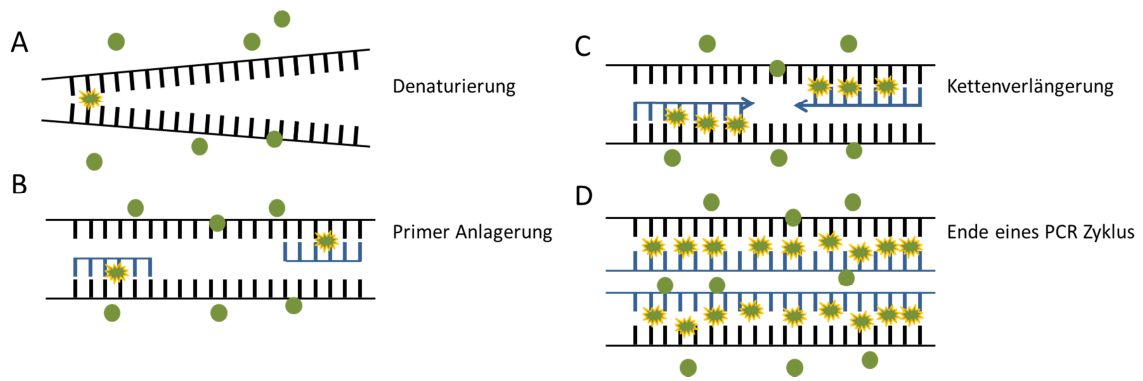


Abbildung 15: Schematische Darstellung des qPCR-Prozesses mit SYBR®Green. Im ersten Schritt (A) wird das als doppelsträngige DNA vorliegende Template denaturiert, SYBR®Green kann nicht mehr interkalieren. Es folgt die Primer Anlagerung (B) und ausgehend von diesen die Kettenverlängerung der beiden Stränge (C). Die SYBR®Green-Fluoreszenz nimmt proportional zur Kettenlänge zu. Am Ende (D) liegen zwei doppelsträngige DNA-Stränge vor, die ein SYBR®Green-Signal erzeugen. Modifiziert nach ^[221].

Als Beurteilung für die jeweils erfolgte Amplifikation dient der sogenannte $c(t)$ Wert (Abbildung 16), dieser stellt die Zykluszahl innerhalb der PCR dar, bei welcher die Fluoreszenz einen gewissen Schwellenwert überschreitet und somit eine signifikante Amplifikation stattgefunden hat. Der $c(t)$ Wert hängt proportional mit der in der Probe enthaltenen Menge an cDNA des Zielgens ab. Je kleiner der $c(t)$ Wert desto mehr Ausgangsmaterial war vorhanden. Für die quantitative Auswertung der Daten wird eine sogenannte $\Delta\Delta c(t)$ Analyse durchgeführt. Hierbei werden die in der qPCR gewonnenen Daten ($c(t)$ Werte) der zu untersuchenden Gene (*genes of interest* GOI) mit denen der Haushaltsgene (*housekeeping genes*) verrechnet. Durch diesen Schritt wird das Expressionslevel der Markergene auf das der Housekeeping-Gene genormt.

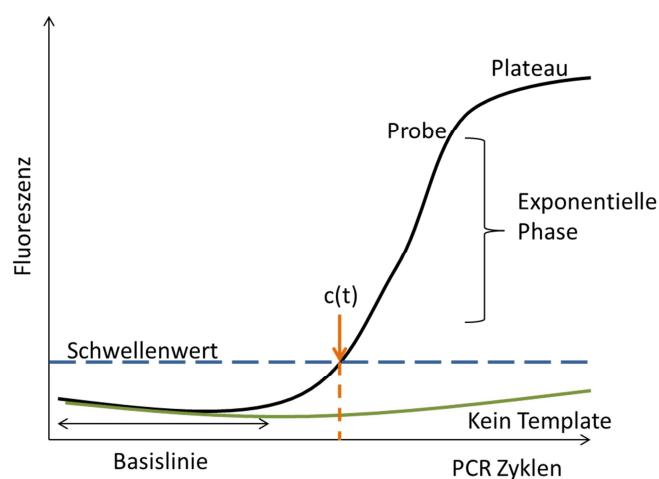


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer qPCR-Kurve.

Housekeeping-Gene stellen Gene dar, die ein konstantes Expressionslevel in den verwendeten Geweben oder Zellen aufweisen, welches auch durch die im Experiment angewendeten Behandlungen nicht verändert wird. Durch die Verwendung von mindestens zwei unterschiedlichen Housekeeping-Genen erlangen die qPCR-Ergebnisse eine höhere Aussagekraft. Für die Berechnung des Expressionslevels wird der nicht-differenzierten Kontrolle ohne Partikel der Wert 1 zugeordnet und die Expression der behandelten Proben in Relation dazu ausgegeben. Die relative Genexpression wird hierbei mit folgender Formel berechnet ^[222]:

Formel 1: Berechnung der normalisierten Genexpression $\Delta\Delta c(t)$. RQ: relative Genexpression.

$$\text{Normalisierte Genexpression } (\Delta\Delta c(t)) = \frac{\text{RQ}_{\text{Sample (GOI)}}}{[\text{RQ}_{\text{Sample (Ref 1)}} \times \text{RQ}_{\text{Sample (Ref 2)}} \dots \times \text{RQ}_{\text{Sample (Ref n)}}]^{1/n}}$$

Nach dem Durchlaufen der gewählten PCR-Zyklen (üblicherweise ca. 40) kann zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Diese dient dem Nachweis, dass in der jeweiligen PCR-Reaktion tatsächlich nur ein (das gewünschte) Produkt gebildet wurde und nicht zusätzlich noch Nebenprodukte oder Primerdimere. Beide würden zu einem falschpositiven Fluoreszenzsignal und somit zu falschen Ergebnissen führen. Die Schmelzkurvenanalyse, die einen Temperaturgradienten von 95 °C-65 °C in 0,5 °C Schritten darstellt, erlaubt die Unterscheidung einzelner Produkte anhand ihrer Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur T_M ist diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der DNA doppelsträngig und die andere Hälfte einzelsträngig vorliegt. Diese Temperatur hängt sowohl von der Länge der DNA, als auch von ihrer Nukleotidzusammensetzung ab.

7 Material

7.1 Geräte

-80 °C Gefrierschrank Hera Freeze Top	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Absaugpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Germany
Brutschrank Inkubator C200	Labotect, Göttingen, Germany
CLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica
CyFlow ML, Messprogramm FloMax 2.6	Partec, Görlitz, Germany
Invertiertes Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg, Germany
Magnetom Trio (3T)	Siemens, Germany
PCR Maschine Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Plate Reader Infinite M1000, Software i-control	Tecan, Crailsheim, Germany
1.6.19.0	
pPCR CFX96 mit C1000 Thermal Cycler	Biorad, München, Germany
Stickstoff Zelltank LS6000	Taylor-Wharton, Mildstedt, Germany
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Germany
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, Germany
Cytopspin 3	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
FACS Canto II	BD, Heidelberg, Germany
Zellzählgerät TC10	Bio-Rad, München, Germany
Sicherheitswerkbank Flow Safe C-[Max Pro] ³ -130	Berner International, Elmshorn, Germany
Pipettierhilfe Accujet Pro	Brand, Wertheim, Germany
Vortexer Reax Control	Heidolph, Schwabach, Germany
Nanodrop 8000	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany

7.2 Verbrauchsmaterial

FACS Röhrchen 3,5 mL PS	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
3-Boden Zellkulturflaschen Nunclon Surface	Nunc, Wiesbaden, Germany
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
15&50 mL Falcons Cell Star	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
Sterile Pipettenspitzen	Biozym, Hess, Germany
Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Well-Platten für Zellkultur	Cellstar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
PCR Platten Low 96 well clear	Bio-Rad, München, Germany
8 well real time low profile PCR Tubes, clear	Brand, Wertheim, Germany
PCR Sealer Microseal `B`Film	Bio-Rad, München, Germany
384 well, low volume, flat bottom	Corning, Wiesbaden, Germany
Cytoträger	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
Filtercards Thick white for use with 0,5 mL samples	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany
CellTrics 30µm green	Partec, Görlitz, Germany
IBIDI Treat 60 µm dish	Ibidi, Martinsried, Germany

7.3 Reagenzien

7-Aminoactinomycin-D	Sigma, München, Germany oder Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland
α-MEM	Lonza, Köln, Germany
CellMask™ Orange	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Ciprofloxacin	Fluka, Buchs, Switzerland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DRAQ5 Zellkernfarbstoff	Biostatus Limited, Shepshed, Leicestershire, United Kingdom

FCS	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Pyruvat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Streptomycin/Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Trypan-Blau (0,4% Lösung)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
May Grünwald Färbelösung	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Giemsa modifed Färbelösung	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HTRF IL-6 und IL-8	HTRF Cisbio, Codolet, France
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München, Germany
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Wachstumsfaktoren und Zytokine hHSC Differenzierung	Invitrogen, Karlsruhe, Germany R&D Systems, Minneapolis, USA
Antikörper	BD, Heidelberg, Germany
hMSC Adipogenic Bulltetkit	Lonza, Basel, Switzerland
α –MEM	Lonza, Basel, Switzerland
Ciprofloxacin	Fluka, Buchs, Switzerland
Oil Red O	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hematoxilin- Harris	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NH Chondro Diff Medium	Miltenyi Biotec
Methylenblau nach Löffler	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
NH Osteo Diff,	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
SigmaFAST BCIP/NBT	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Top Vision™ LM GQ Agarose	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, Germany
Kaliumhexacyanoferrat II	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DMSO Hybri-Max	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BMP-2 (rekombinantes Protein)	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNase away	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA

8 Durchführung

8.1 Zellkultur

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) wurden aus Knochenmarkspiraten oder Hüftgelenken mit Einwilligung der jeweiligen Spenderperson gewonnen. Diese Studien wurden von der Ethikkommission der Universität Ulm und Freiburg bewilligt. Primäre hMSCs wurden nach einer bekannten Methode^[223] gewonnen und in α -MEM mit 20% FCS, 100 Einheiten Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptavidin, 1 mM Natriumpyruvat und 0,6% Ciprofloxacin in einem befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden bei ca. 80% Konfluenz passagiert, indem sie einmal mit PBS^- (phosphate buffered saline: Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Magnesium und Kalzium Ionen) gespült und 10 min mit 0,5% Trypsin inkubiert wurden. hMSCs wurden für die Differenzierungsversuche bis Passage 5 und für Partikelauftahmetests bis Passage 10 verwendet.

8.2 Durchflusszytometrie

Für Partikelauftahme und Toxizitätstests wurden MSCs in einer Dichte von 10.000 Zellen/ cm^2 in 6-well Platten ausgesät. Nach Erreichen der Adhärenz (über Nacht) wurden die Zellen mit 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Partikel für 24 h inkubiert und anschließend am CyFlow ML analysiert. hMSCs wurden in einer Dichte von mindestens $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 12-well ausgesät, direkt mit 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Partikel für 24 h inkubiert und am BD Canto II gemessen. Die Probenvorbereitung ist für beide Zelllinien identisch. Die Zellen wurden einmal mit PBS^- gewaschen, im Fall eines Toxizitätstests mit 28,6 mg/mL 7-AAD für 15 min im Dunkeln inkubiert, anschließend noch einmal mit PBS^- gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

Das Signal der Vorwärtsstreuung der Zellen (FSC) wird gegen das Signal der Seitwärtsstreuung (SSC) aufgetragen und in diesem Plot die Zellpopulation ermittelt. Die Fluoreszenzmessung der verwendeten PMI-Partikel erfolgt im FL1-Kanal (Anregung 488 nm, Detektion 527 nm), das 7-AAD Signal wird im FL3-Kanal (Anregung 488 nm, Detektion 682 nm) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software FCS Express V3 (De Novo Software, CA, USA). Die ermittelten Werte des PMI-Signals stammen aus dem Median des Fluoreszenzhistogramms. Das 7-AAD-Signal wurde gegen das PMI-Signal aufgetragen, in diesem Diagramm wurden drei Populationen festgelegt, die lebende, apoptotische und tote Zellen darstellen. Die prozentualen Zellanteile in der jeweiligen Population wurden als Ergebnis des Toxizitätstests angegeben.

8.3 cLSM Probenvorbereitung

hMSCs wurden in einer Konzentration von 10.000 Zellen / IBIDI Treat ausgesät. Partikelzugabe und Inkubation erfolgt analog zu 8.2. Nach Beendigung der Partikelinkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und in PBS⁻ belassen. Zur besseren Darstellung wurde der Zellkern mit dem Farbstoff DraQ5 (1,25 nmol/mL) und die Zellmembran mit Cell Mask Orange (1,25 µg/mL) angefärbt. Die Analyse mit dem cLSM erfolgte unmittelbar im Anschluss. PMI wurde hierbei analog zu den durchflusszytometrischen Messungen bei 488 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 510-540 nm ausgelesen. Der Zellmembranfarbstoff Cell Mask Orange wurde mit 543 nm angeregt und bei 565-585 nm ausgelesen. Der Kernfarbstoff DraQ5 wurde mit 633 nm angeregt, die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte bei 650-670 nm. Für die Aufnahmen wurde ein 63 x Öl Objektiv (HCX PL APO CS 63x/1,4 -0,6 oil) verwendet. Alle Bilder wurden im seriellen Modus, d.h. nach Fluoreszenzkanälen getrennt, aufgenommen. So wurde ein Crosstalk zwischen den einzelnen Kanälen vermieden.

8.4 Differenzierung von hMSCs

Alle Zellen wurden vor der Induktion der Differenzierung 24 h lang mit 300 µg/mL Partikel inkubiert.

8.4.1 Adipogene Differenzierung

hMSCs wurden in 6-wells (Histologische Färbung) oder 12-wells (RNA Isolierung) in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausgesät und bis zur Konfluenz in α -MEM mit den oben genannten Zusätzen kultiviert. Die Differenzierung wurde durch Zugabe von Adipogenic Induction Medium induziert und drei Wochen lang das Medium zweimal die Woche gewechselt (abwechselnd Adipogenic Induction Medium und Adipogenic Maintenance Medium). Danach folgte eine Woche Kultivierung in Adipogenic Maintenance Medium. Anschließend erfolgte entweder eine RNA-Isolierung oder eine histologische Färbung mit Oil Red-O.

8.4.2 Chondrogene und osteogene Differenzierung

hMSCs wurden in 6-wells (Histologische Färbung) oder 12-wells (RNA-Isolierung) in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät. Die Differenzierung wurde durch Zugabe von NH Chondro Diff Medium bzw. NH Osteo Diff Medium nach Erreichen der Konfluenz induziert und 24 Tage lang weiter kultiviert, wobei zweimal die Woche ein Mediumwechsel erfolgte.

8.5 Histologische Färbungen

8.5.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Die osteogene Differenzierung wurde auf histologischer Ebene mit dem Nachweis der Alkalischen Phosphatase Aktivität belegt. Hierfür werden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gespült und anschließend für 1 h mit 4% Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden 30 min im Dunkeln mit der Färbelösung (1 Tablette SigmaFAST BCIP/NBT in 10 mL Aqua dest. lösen) inkubiert, danach zweimal mit Aqua dest. gewaschen und am inversen Lichtmikroskop fotografiert. Durch die Färbung werden Stellen mit Alkalischer Phosphataseaktivität violett dargestellt.

8.5.2 Methylenblau Färbung

Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte mit Hilfe der Methylenblaufärbung, hierbei werden die Bestandteile der extrazellulären Matrix, die während der Differenzierung entsteht, angefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen und mit Methanol für 5 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mindestens 1,5 h getrocknet. Die Färbung erfolgte für 1,5 h mit Methylenblau-Lösung nach Löffler im Dunkeln. Die Zellen wurden zum Abschluss zweimal mit Aqua dest. gespült und am inversen Lichtmikroskop analysiert.

8.5.3 Oil Red-O Färbung

Die während der adipogenen Differenzierung entstehenden Fettvakuolen wurden mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red-O nachgewiesen. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit PBS⁻ gewaschen und für 45 min mit 4% Formaldehyd fixiert, anschließend zweimal mit Aqua dest. gespült und ein zweites Mal mit 60% Isopropanol für 4 min fixiert. Für die Färbung wurde die Oil Red-O-Stocklösung (300 mg Oil Red-O auf 100 mL Isopropanol) 3:2 mit Aqua dest. gemischt und für 5 min auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden solange mit Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar war. Als Gegenfärbung wurde mit Hematoxilin-Harris gefärbt. Dies ermöglicht die Darstellung des Zellkerns in

blauviolett. Anschließend wurde wieder solange mit warmem Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar war. Die Analyse der Proben erfolgte am inversen Lichtmikroskop.

8.6 Differenzierung von hHSCs

hHSCs wurden im Stammzelllabor des Universitätsklinikum Mainz mit Einwilligung der Spender durch CD34⁺-Selektion durch Apherese gewonnen. Diese Studie wurde von der Ethikkommission Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Zellen wurden für jeden Versuch frisch aufgetaut und mit den in Tabelle 1 angegebenen Zusätzen nach ^[224] in die jeweilige Richtung differenziert. Als Basismedium diente IMDM mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin und 100 µg/mL Streptavidin. Die Zellen wurden für eine Dauer von 11 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Brutschrank kultiviert. Vor Beginn der Differenzierung wurden die Zellen für 24 h mit 300 µg/mL Partikel in Basismedium inkubiert, die überschüssigen Partikel wurden anschließend mit PBS⁻ gewaschen und die Differenzierung gestartet. Für Partikelaufnahme- und Toxizitätstests wurden die Zellen genauso behandelt, jedoch nicht differenziert, sondern direkt nach 24 h analysiert.

Tabelle 1: Übersicht der Zusätze für die Differenzierung von hHSCs.

Differenzierungsrichtung	Zusätze
Erythropoese	SCF (50 ng/mL), Flt 3 ligand (50 ng/mL), IL 3 (10 ng/mL), EPO (10 U/mL)
Granulopoese	SCF (50 ng/mL), Flt 3 ligand (50 ng/mL), IL 3 (10 ng/mL), G – CSF (10 ng/mL), GM- CSF (10 ng/mL)
Megakaryopoese	SCF (50 ng/mL), Flt 3 ligand (50 ng/mL), TPO (20 ng/mL)

8.7 CD-Oberflächenmarker Färbung

Die CD-Oberflächenmarker differenzierter hHSCs wurden mit Hilfe einer Antikörperfärbung nachgewiesen. Die für die jeweilige Differenzierungsrichtung spezifischen CD-Marker sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht der für den Nachweis der Differenzierung der hHSCs verwendeten CD-Marker.

Differenzierungsrichtung	CD-Marker
Erythropoese	CD71, CD235a
Granulopoese	CD11b, CD15
Megakaryopoese	CD41a, CD42b

Für die Antikörperfärbung wurden die Zellen einmal mit PBS⁻ gewaschen, wieder resuspendiert und mit den entsprechenden Antikörpern versehen. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C gefärbt und anschließend nochmals mit PBS⁻ gewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit 1% Formaldehyd in PBS⁻. Die Antikörperfärbung wurde im Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet.

8.8 Pappenheim-Färbung

Diese Färbung dient dem histologischen Nachweis der hHSC Differenzierung. 500 µL differenzierte Zellen mit einer Konzentration von 4×10^5 /mL in PBS wurden in eine Cytospin-Kammer, die mit entsprechenden Filterkarten und Cytoträgern bestückt waren, gefüllt und für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Kammer vorsichtig auseinander gebaut und das Präparat für mindestens 1 h an der Luft getrocknet. Für die Färbung wurde der Objektträger für 3 min mit May-Grünwald-Färbelösung bedeckt. Anschließend wurde die gleiche Menge Ampuva (pH 7,2) dazugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Der Objektträger wurde danach sofort in ein neues Färbefach überführt und mit 1:10 in Ampuva (pH 7,2) verdünnter Giemsa Färbelösung für 20 min inkubiert. Die gefärbten Objektträger wurden mit Ampuva (pH

7,2) gespült und anschließend an der Luft getrocknet. In Tabelle 3 sind die jeweiligen Färbeergebnisse der unterschiedlichen Blutzellen aufgeführt.

Tabelle 3: Darstellung unterschiedlicher Blutzellen nach einer Pappenheim Färbung.

Zellbestandteile	Färbeergebnis
Leukozyten-Kerne	rotviolett
Lymphozyten-Zellplasma	hellblau
Monozyten-Zellplasma	grau-blau
Thrombozyten	blau mit violetter Kern
Neutrophilen-Granula	hellviolett
Eosinophilen-Granula	rotbraun
Basophilen-Granula	dunkelviolett-schwarz
Erythrozyten	blassrosa

8.9 RNA-Isolierung

Die Isolierung der kompletten RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits von Qiagen, für einen besseren Zellaufschluss wurden Qiashreder-Säulchen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der RNA erfolgte mit zweimal 20 µL RNase freiem Wasser. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde vor der cDNA-Synthese mit Hilfe des Nanodrops bestimmt.

8.10 cDNA-Synthese

500 µg RNA wurden mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kits von Bio-Rad in einem 20 µl Ansatz nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung am Nanodrop.

8.11 Quantitative real-time-PCR (qPCR)

qPCR-Reaktionen wurden mit dem iQ SYBR[®] Green-Supermix von Bio-Rad in einem CFX96 Real-Time-Detektions-System von Bio-Rad durchgeführt. Das verwendete Programm enthält folgende Komponenten:

- Initiale Denaturierung 3 min 95 °C
 - 95 °C 10 s
 - 60 °C 10 s
 - 72 °C 30 s
 - 60 °C 10 s
 - 72 °C 30 s
 - Schmelzkurvenanalyse (65 °C bis 95 °C mit einer Schrittgröße von 0,5 °C) 5 min
- } 40 Zyklen

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des CFX-Managers von Bio-Rad ausgewertet. Die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Mikroglobulin (B2M) wurde für die Normalisierung der Genexpressionslevel bei hMSC Versuchen verwendet (Housekeeping Gene). Die Expression der 18s-RNA wurde bei hHSC Versuchen als Housekeeping-Gen verwendet. Die normalisierte relative Genexpression der einzelnen Markergene wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta c(t)$ -Methode berechnet, hierbei wurde die Expression der nicht behandelten nicht differenzierten Probe auf 1 gesetzt. Die Genexpression $\Delta c(t)$ wurde berechnet, wenn das Zielgen nicht in der Tag 0 Probe exprimiert wurde.

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Primer mit ihrer Sequenz und der Produktgröße aufgeführt.

Tabelle 4: Sequenz der für die qPCR verwendeten Primer.

	Forward	Reverse	PCR Produktlänge [bp]	Annealing Temperatur [°C]
GABDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	AATGAAGGGGTCATTGATGG	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	108	60
B2M (β2 microglobulin)	TCTCTGCTGGATGACGTGAG	TAGCTGTGCTCGCGCTACT	90	60
FABP4 (fatty acid binding protein 4)	TGATGATCATGTTAGGTTTGCC	TGGAAACTTGTCTCCAGTGAA	106	60
CIDE 3 (cell death-inducing DFFA-like effector c)	CAGTTGTGCCATCTTCCTCC	AAGGGCATCATGGCTTACAG	109	60
TIMP4 (TIMP metalloproteinase inhibitor 4)	GGCTCGATGTAGTGCACAG	ACGCCTTTGACTCTTCCT	125	60
Osteopontin	CTC AGG CCA GTT GCA GCC	GCC ACA GCA TCT GGG TAT TT	177	60
ALPI II (alkaline phosphatase)	CCT CGG AAG ACA CTC TGA CC	CCA CCA AAT GTG AAG ACG TG	61	60
RAP1GA1 (RAP1, GTPase activating protein 1)	ACAGGTCTAGTGCCTGAGGG	CCCTTGGGGTGGACAAG	90	63
GPE (Glycophorin E)	CACACCAGTGGTACTTGATGC	TGCACTAATTCAGGAGCCA	110	60
ARHGAP8 (Rho GTPase activating protein 8)	TCTCTTGGCCAGTCACT	ATTCCACCTGTGCCACC	109	63
CEACAM (Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1)	GAGAGGCCATTTCTGTGG	GGGACGTATTGGTGTGAGGT	104	63
P2RY13 (G protein coupled receptor 86)	TGTCATTATCAAGTCGGCCA	CTTTGGCTCTGTGGGTGTTT	92	60
IL2RA (Interleukin 2 receptor alpha)	TAGGCCATGGCTTTGAATGT	ACTGCTCACGTTTCATCATGG	96	63
ITGA2B (Integrin, alpha2b (CD41b)),	CTCCAGGGGCACAGGAAC	ACTTCCACAAGGACAGCCAT	106	60
PBX1 (Pre B cell leukemia transcription factor 1)	GTCTGTGGGTTCTCTCTCT	AACTGCCACAGAATGAAGCC	102	60
TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells)	AGTCATAGGGCAAGACACC	CCGGCTGCTCATCTTACTCT	107	60
18 s RNA (RRN18S)	Kommerzieller Primer von tataabiocenter (Bestandteil Reference Gene human Panel)	www.tataa.com		60
RUNX2 runt-related transcription factor 2)	CCTAAATCACTGAGGCGGTC	CAGTAGATGGACCTCGGGAA	91	60
SOX9 SRY (sex determining region Y)-box 9)	GTAATCCGGGTGGTCTCTCT	GACGCTGGGCAAGCTCT	106	60
TGFB1 (transforming growth factor, beta 1)	CTCCAGCCGAGGTCCTT	CCCTGGACCAACTATTGC	92	60
Agg2 (Aggrecan)	TCT GTA ACC CAG GCT CCA AC	CTG GCA AAA TCC CCA CTA AA	199	60
Coll2 (Collagen 2)	CGCACCTGCAGAGACCTGAA	TCTTCTGGGAACGTTTGTGG	162	60

8.12 HTRF-Assay

Die quantitative Bestimmung des IL-6 und IL-8 Levels im Überstand einer Zellkulturprobe wurde mit Hilfe der Human IL-6 und Human IL-8 HTRF[®]-Assays von Cisbio Bioassays durchgeführt. Hierbei wurde das vom Hersteller angegebene Zell-Überstandprotokoll verwendet. Als Material für diese Tests dienten die Überstände von Zellkulturen. Diese wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 12-well Platten (hMSCs) oder 0,5 x 10⁶/12-well (hHSCs) ausgesät und mit 300 µg/mL Nanopartikel für 24 h inkubiert. Die Partikel wurden durch zweimaliges Spülen mit PBS⁻ entfernt und die Zellen für 5 Tage mit frischem Medium inkubiert (hMSCs α-MEM; hHSCs IMDM mit zusätzlich SCF und Ftl 3-Ligand). Die Tests wurden in 384-well Platten in 20 µL Reaktionen durchgeführt und im Platerader mit den Einstellungen des Herstellers gemessen. Die Daten wurden anschließend mit der Magellan V6.6 Software von Tecan analysiert und basierend auf einer Kalibrationskurve (im Kit enthalten) quantitativ ausgewertet.

8.13 Probenvorbereitung für MRT Messung

Die zu messende Probe wird mit 2 % Low melt Agarose , welche mit 1x PBS angesetzt wurde, vermischt und die Agarose blasenfrei in ein Well eines Cultureslides aus Polystyrol. gefüllt. Der Cultureslide wird in einem 50 mL Falcon komplett mit 2 % Low melt Agarose vergossen. Dieser Falcon wird in einer speziell angefertigten Kleintierspule (Kerstin Münnemann, MPIP) im MRT vermessen.

8.14 MRT Messung

Die Messung der Proben erfolgt in der Universitätsklinik Mainz an einem 3T MRT Gerät (Magnetom TRIO, Siemens) mit einer speziell angefertigten Messspule durch Kerstin Münnemann und Stefan Weber.

8.15 Auswertung der MRT Messdaten

Die Auswertung der MRT Daten erfolgt mit den Programmen ImageJ, Microsoft Excel und Origin. Bei diesem Auswertungsprozess werden aus den Graustufen des MRT Bilds über mehrere Rechenschritte die Relaxationszeiten $1/T_1$, $1/T_2$ und $1/T_2^*$ berechnet. In ImageJ werden die MRT Aufnahmen im Stack zu einem Graustufenbild umgewandelt und die hieraus resultierenden Signalintensitäten für die Berechnung der Relaxationszeiten verwendet. Hierzu werden in Origin folgende Fitformeln benutzt:

T1:

$$SI = \text{abs}(A_0 * (1 - 2 * FA * \exp(-x/T_1)))$$

SI= Signalintensität, entspricht der Grauabstufung im MRT Bild

FA= Flipwinkel der MRT Messung, in der Regel 0,5

X= T1 (Messzeit)

T2 und T2*:

$$SI = A_0 * \exp(-TE/T_2)$$

SI= Signalintensität, entspricht der Grauabstufung im MRT Bild

A0= Parameter, der die Ausgangsmagnetisierung des verwendeten Materials angibt

TE= Messzeit

8.16 H¹ NMR Messung

Die zu messenden Proben werden 3-mal mit Ampuwa gewaschen und anschließend über Nacht bei 110°C im Trockenofen getrocknet. Die getrocknete Probe wird einer Mischung aus 2/3 70 % Perchlorsäure und 1/3 65 % Salpetersäure für 3 h bei 50°C im Wasserbad verdaut. Die Proben werden am 7 T NMR mit dem 10 mm BB Probenkopf vermessen (Parameter P1 222 μ s bei pL=3 dB). T1 wird über einen Area Fit des Peaks ermittelt.

8.17 UV/VIS Messung

Die zu messenden Proben werden 3-mal mit Ampuwa gewaschen und anschließend über Nacht bei 110°C im Trockenofen getrocknet. Die getrocknete Probe wird mit 5 M HCl für 4 h bei 60°C im Wasserbad verdaut und diese Mischung anschließend im UV/VIS bei einer Absorption von 351 nm gemessen.

8.18 Berliner Blaufärbung

Mit Hilfe der Berliner Blaufärbung werden Eisenaggregate im Zellinneren dargestellt. Die Zellen werden 3-mal mit PBS⁻ gewaschen und nach einer 10 minütigen Fixierung in Methanol an der Luft getrocknet. Anschließend werden die Proben im Well für 10 min mit folgender Mischung gefärbt: 1:1 0,1 N HCl und 2% Kaliumhexacyanoferrat II Lösung (diese wird mit Ampuwa frisch angesetzt). Nach der Färbung werden die Zellen einmal mit Ampuwa gewaschen und für 10 min mit Hämatoxin Eosin gegengefärbt. Zum Schluss werden die Zellen erneuert 3-mal mit Ampuwa gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung erfolgt an einem inversen Mikroskop mit Farbkamera.

8.19 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung angegeben. Soweit es nicht anders vermerkt ist, wurden alle Versuche dreimal durchgeführt, wobei die einzelnen Durchgänge jeweils auch mindestens mit Duplikaten durchgeführt worden sind. Die Daten der qPCR und HTRF-Assays wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (one way ANOVA) mit nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test mit Hilfe der Software Prism[®]5 (GraphPad Software) untersucht. Eine statistische Differenz von $p < 0,05$ wird als signifikant angesehen. Die Signifikanz einzelner Ergebnisse wird in Abbildungen wie folgt dargestellt: $p > 0,05$ ns (nicht signifikant), $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

9 Ergebnisse und Diskussion

9.1 Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel

Als Modellsysteme zur systematischen Untersuchung des Einflusses von polymeren Nanopartikel auf hMSCs und hHSCs wurden bioinerte Polystyrol-Partikel und bioabbaubare PLLA-Partikel ausgewählt. Die Polystyrol-Partikel wurden mit Hilfe der Miniemulsionstechnik [218], die PLLA-Partikel mit Hilfe einer Kombination von Miniemulsion und Emulsion/ Lösungsverdampfungs-Technik [219, 220] hergestellt. Beide Modellsysteme wurden in verschiedenen Arbeiten der Arbeitsgruppe für unterschiedliche Zellversuche verwendet. Bei der Wahl der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel wurde darauf geachtet, nur bestimmte Parameter der Partikel zu variieren (Oberflächenfunktionalisierung, Tensid oder Polymer). In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Partikel mit ihren Eigenschaften aufgeführt. Abbildung 17 zeigt TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) Aufnahmen der Partikel.

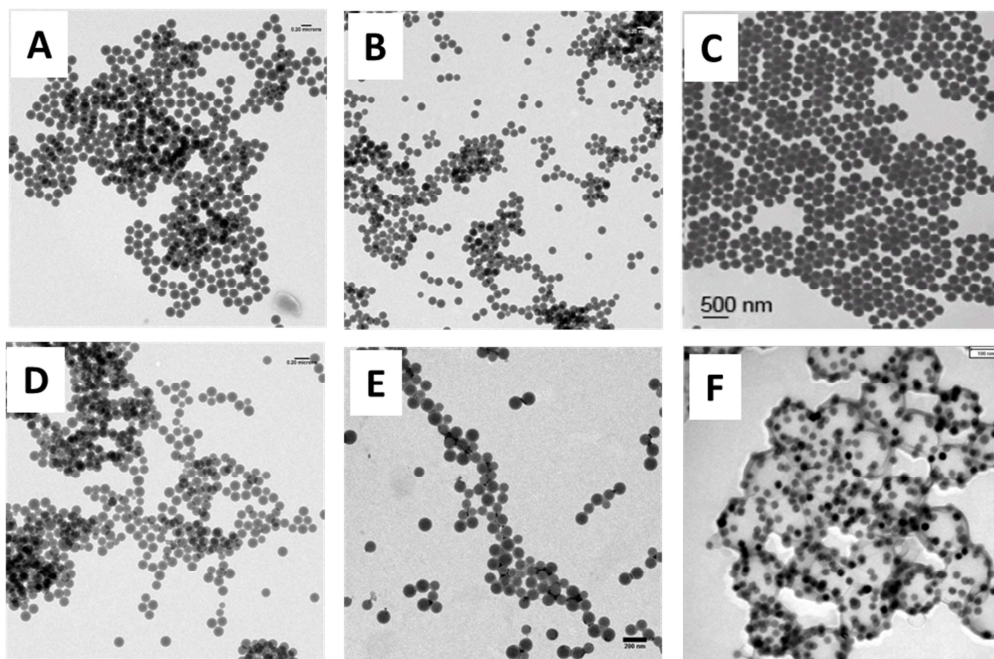


Abbildung 17: Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen unterschiedlicher Nanopartikel A: AM-NSC5-2PM; B: AM-SC-PM; C: AM-SL-PM; D: AM-ASS5-PS; E: AM-SS-PS; F: MU119 55zdz N11-N14. Bilder A –E von Anna Musvyanovych, F Dissertation Markus Urban.

Tabelle 5: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel. Partikel, die auch für Differenzierungsversuche verwendet wurden, wurden mit einer Bezeichnung im Text versehen.

Name	Hersteller	Bezeichnung im Text	Polymer	Funktionelle Gruppen/nm ²	Oberflächen- funktionalisierung	Partikelinhalt	Tensid	Ø [nm]	Zeta Potential [mV]
AM-ASS5-PS	A. Musvyanovych	PS-COOH	Poly(styrol- co- Acrylsäure)	0,4	COOH	PMI	SDS	121	-46
AM-SS-PS	A. Musvyanovych	PS	Polystyrol			PMI	SDS	116	-45
AM-NSC5-2PM	A. Musvyanovych		Poly(styrol co AEMH)	0,13	NH ₂	PMI	CTMA-Cl	120	+53
AM-SC-PM	A. Musvyanovych		Polystyrol			PMI	CTMA-Cl	100	+49
AM-NSL3-2PM	A. Musvyanovych		Poly(styrol co AEMH)		NH ₂	PMI	Lutensol	182	+8
AM-SL-PM	A. Musvyanovych		Polystyrol			PMI	Lutensol	175	+4
MU119-5zdz N11- N14	M.Urban	PLLA-Fe	PLLA (140,000 g/mol)			PMI/ Magnetit (2,53mg Fe/ mL Dispersion)	SDS	124	-30
MU111-1zd N4	M.Urban	PLLA	PLLA (140,000 g/mol)			PMI	SDS	131	-29

9.2 Interaktion von Nanopartikeln mit hMSCs ^[225]

Die Auswirkungen unterschiedlicher NP auf das Differenzierungsverhalten von hMSCs wurde immer in gleicher Weise getestet. Zu Beginn der Arbeit wurde eine zu inkubierende Partikelmenge von 300 µg/mL festgelegt. Hierbei handelt es sich um eine relative hohe Partikelkonzentration. Diese sollte jedoch für einen möglichst aussagekräftigen Effekt sorgen oder, wenn keine Effekte zu beobachten wären, zeigen, dass diese Partikel auch in hohen Konzentrationen keinen Effekt auf die Zellen haben. Als Inkubationszeitraum wurde 24 h festgesetzt.

Im ersten Schritt wurde die zelluläre Aufnahme und Toxizität eines Partikels mittels Durchflusszytometrie und cLSM getestet. Zeigten diese Messungen sowohl eine gute Aufnahme als auch keine oder nur eine geringe Toxizität, wurden sie für Differenzierungsversuche eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Zellfunktionalität überprüft. Hierbei wurde die Zytokinsekretion als Maß für die Zellfunktionalität untersucht.

9.2.1 Partikelaufnahme und Toxizität

Im Rahmen der Differenzierungsversuche sollen unterschiedliche Materialien, Tenside sowie Oberflächenfunktionalisierungen auf ihre Wirkung auf hMSCs getestet werden. Hierzu wurden zwei Sets aus ungefähr gleich großen Polystyrol NP (hergestellt von Anna Musvyanovych) gewählt, die jeweils aus einem funktionalisierten und einem unfunktionalisierten NP bestehen und ebenfalls mit dem gleichen Tensid mittels Miniemulsion hergestellt wurden ^[226] (vergleiche auch Tabelle 5). Diese Partikel dienen als Modellsystem für bioinerte NP. Als Modellsystem für bioabbaubare NP wurden die PLLA NP von Markus Urban gewählt ^[227]. Gleichzeitig konnte mit dem PLLA-System der Einfluss von Magnetit in Partikeln auf hMSCs getestet werden.

Die Polystyrol-NP zeigen im Durchflusszytometer ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten, abhängig von der jeweiligen Oberflächenfunktionalisierung und dem verwendeten Tensid (vergleiche Abbildung 18). Die Partikel mit Lutensol als Tensid zeigen hierbei das schlechteste Aufnahmeverhalten sowohl in ihrer unfunktionalisierten

(AM-SL-PM) als auch in ihrer aminofunktionalisierten (AM-NSL-2-3PM) Form. Die Aufnahme der unfunktionalisierten SDS-(AM-SS-PM) und CTMA-Cl (AM-SC-PM)-Partikel ist deutlich besser als die des unfunktionalisierten Lutensol-(AM-SL-PM) Partikels.

Die Funktionalisierung der Partikel mit Carboxylgruppen (AM-ASS5-PM) oder Aminogruppen (AM-NSC5-2-PM) führt zu einer deutlich erhöhten Partikelaufnahme. Hierbei zeigt sich der amino-funktionalisierte Partikel als der am besten aufgenommene Partikel dieser Testreihe. Alle getesteten Partikel zeigen eine sehr geringe Toxizität im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse (vergleiche Abbildung 19). Die Überprüfung der Partikelaufnahme im cLSM zeigt, dass die gemessenen Fluoreszenzsignale in der Durchflusszytometrie tatsächlich von aufgenommenen Partikeln stammen und nicht von an der Oberfläche adhären Partikeln.

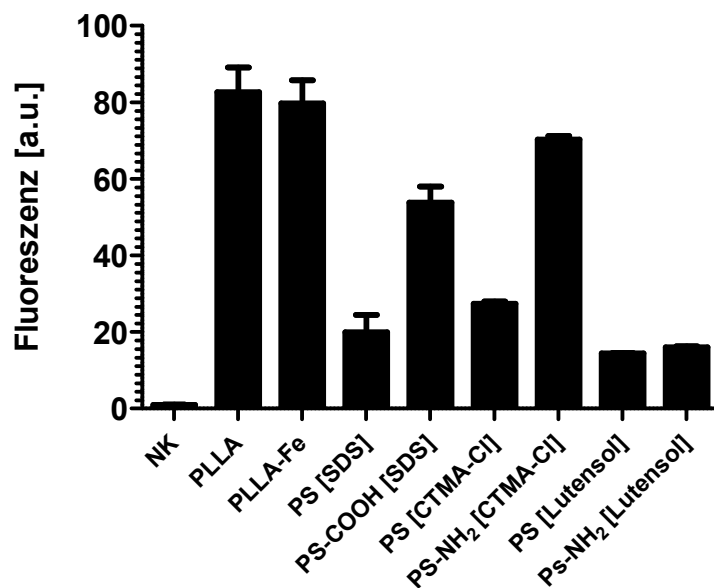


Abbildung 18: Aufnahme unterschiedlicher Nanopartikel in hMCSc nach 24 h Inkubation mit 300 µg/mL Partikel. Die Aufnahme der Partikel wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. PS [SDS]: AM-SS-PS; PS-COOH [SDS]: AM-ASS5-PS; PS [CTMA-Cl]: AM-SC-PM; PS-NH₂ [CTMA-Cl]: AM-NSC5-2PM; PS [Lutensol]: AM-SL-PM; PS-NH₂ [Lutensol]: AM-NSL3-2PM.

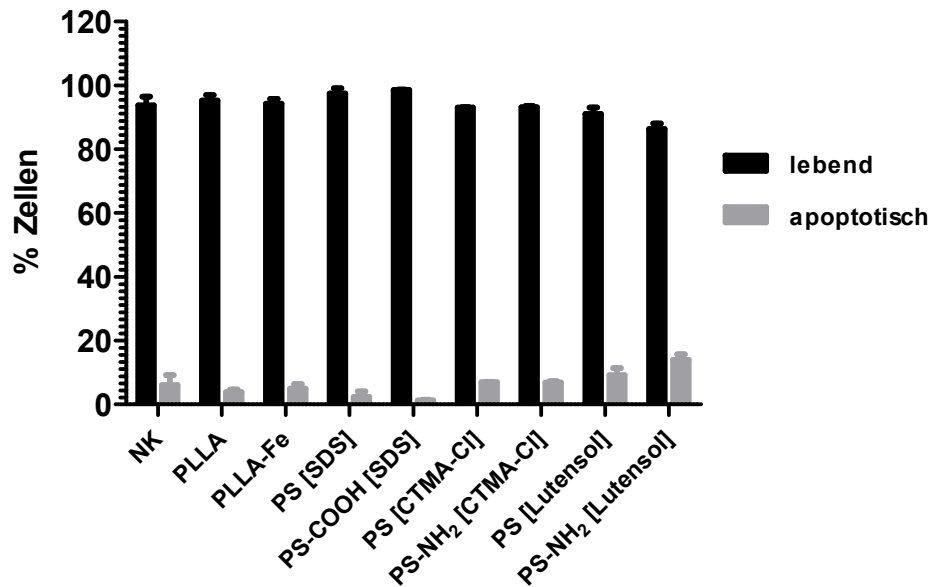


Abbildung 19: Toxizitätsmessung an hMSCs nach 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Nanopartikeln (300 µg/mL). Tote Zellen werden nicht dargestellt, da ihre Anzahl immer unter 1 % lag. PS [SDS]: AM-SS-PS; PS-COOH [SDS]: AM-ASS5-PS; PS [CTMA-Cl]: AM-SC-PM; PS-NH₂ [CTMA-Cl]: AM-NSC5-2PM; PS [Lutensol]: AM-SL-PM; PS-NH₂ [Lutensol]: AM-NSL3-2PM.

Auch die Aufnahme der bioabbaubaren PLLA-Partikel stellt sich bei den durchflusszytometrischen Messungen als sehr gut dar, wobei das im PLLA-Fe enthaltene Magnetit keinen Einfluss auf die Partikelaufnahme zeigt. Beide PLLA-Partikel zeigen eine sehr geringe Toxizität (vergleiche Abbildung 19). Wie auch schon bei den Polystyrol-Partikeln konnte auch hier die tatsächliche Aufnahme der Partikel mittels cLSM nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 20).

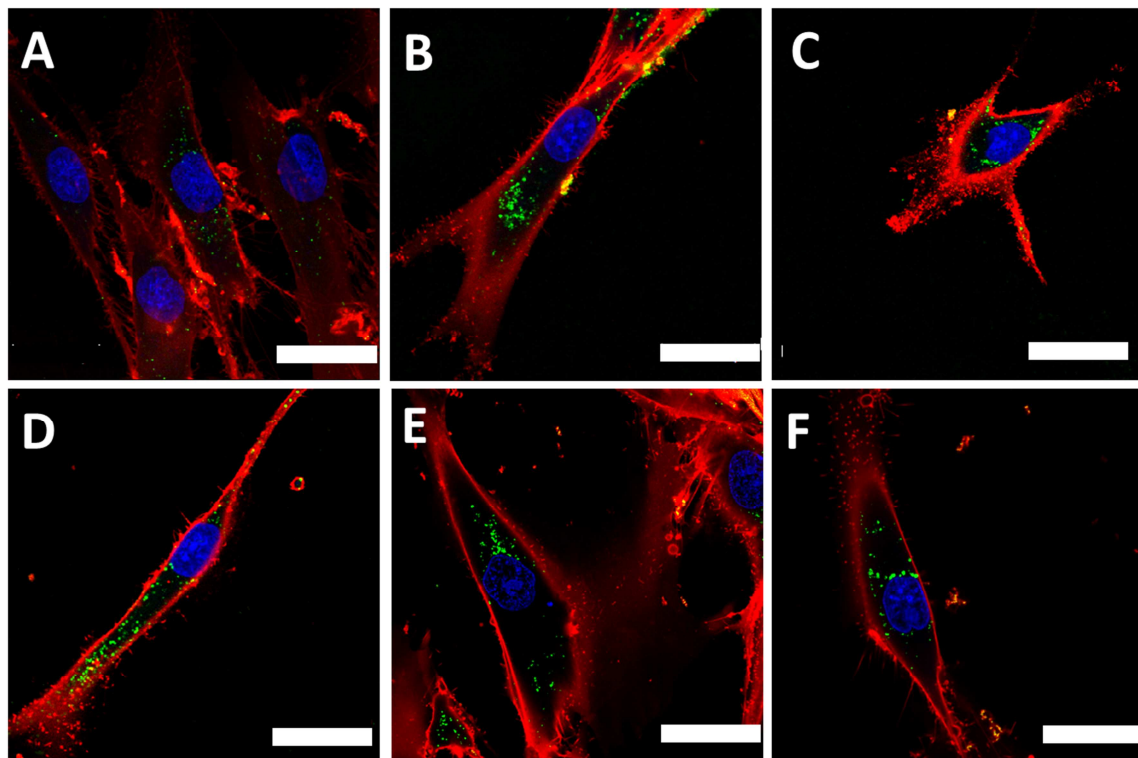


Abbildung 20: cLSM Analyse der Aufnahme unterschiedlicher NP in hMSC Die Zellmembran (rot) wurde mit Cell Mask Orange gefärbt, der Kern (blau) mit DraQ5. NP sind in grün dargestellt. A: PS [SDS], B: PS-COOH [SDS], C: AM-NSL3-2PM (PS-NH₂, Lutensol), D: AM-NSC5-2PM (PS-NH₂, CTMA-Cl), E: PLLA, F: PLLA-Fe. Der Größenbalken repräsentiert 25µm.

Für die Differenzierungsversuche wurden Polystyrol- sowie PLLA-Partikel auf Grund ihrer guten Aufnahme und geringen Toxizitätswerte verwendet. Mit Hilfe der Polystyrol-Partikel ließ sich der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung mit Carboxylgruppen auf die Differenzierung von hMSCs gut untersuchen (vergleiche Tabelle 5). Der aminofunktionalisierte AM-NSC5-2PM-Partikel konnte trotz guter Aufnahme und Toxizitätswerte nicht für Differenzierungsversuche verwendet werden, da er ebenso wie der nicht-funktionalisierte AM-SC-PM-Partikel innerhalb der Differenzierungen nach ungefähr 10 Tagen toxisch für die Zellen war und zum kompletten Absterben der Zellen geführt hat. Die beobachtete Langzeittoxizität ist höchstwahrscheinlich auf das verwendete Tensid CTMA-Cl zurückzuführen. Eine Toxizität von hohen Dosen an mit CTMA-Cl hergestellten Partikeln konnte schon in früheren Arbeiten der Gruppe beobachtet werden ^[228, 229], wobei die Toxizität hier direkt nach der Partikelinkubation festzustellen war. Hierbei handelte es sich um PLLA- und nicht um PS-Partikel. PLLA besitzt eine negative Ladung durch COOH-Gruppen in der Polymerkette und kann so stärker mit den positiv geladenen CTMA-Cl Molekülen interagieren als das inerte

Polystyrol ^[228]. In dem hier beobachteten Fall der Langzeittoxizität der CTMA-Cl-stabilisierten Partikel ist es denkbar, dass die Toxizität nicht direkt von CTMA-Cl Molekülen verursacht wird, sondern von Abbauprodukten des CTMA-Cl innerhalb der Zelle. In der Literatur ist dieses Phänomen noch nicht untersucht worden. Es handelt sich hier auch nicht um eine zelllinienspezifische Beobachtung, da eine Langzeittoxizität der CTMA-Cl-Partikel auch für hMSCs beobachtet werden konnte.

Beide PLLA-Partikel wurden auf Grund ihrer guten Aufnahme und Toxizitätswerte für die Differenzierungsversuche verwendet.

9.2.2 Zytokinsekretion

Neben einer guten Zellaufnahme und einer sehr geringen oder nicht vorhandenen Toxizität ist es auch essentiell, dass NP sich nicht auf die Funktionalität von hMSCs auswirken. *In vivo* und *in vitro* sekretieren hMSCs unterschiedliche Zytokine, die *in vivo* u.a. für die immunmodulatorischen Eigenschaften der hMSCs verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde die Sekretion zweier Zytokine (IL-6 und IL-8, ^[26, 230]) nach 24 stündiger Inkubation mit 300 µg/mL Partikel untersucht. Hierbei zeigte sich die IL-6 Sekretion in Anwesenheit aller getesteter Partikel unverändert (siehe Abbildung 21).

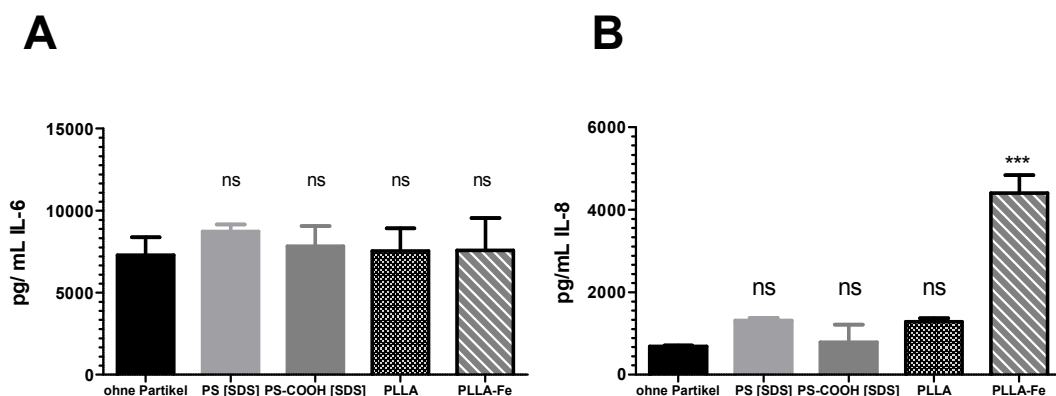


Abbildung 21: Zytokinsekretion von hMSCs nach Inkubation mit unterschiedlichen Nanopartikeln. A IL-6; B IL-8.

Im Gegensatz dazu zeigt sich die IL-8 Sekretion in Anwesenheit der PLLA-Fe-Partikel signifikant um ein Vielfaches erhöht. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Anwesenheit von freien Eisenionen zurückzuführen, die von den Partikeln freigegeben werden. Freien Eisenionen innerhalb einer Zelle können zu einem Anstieg des oxidativen Stress Levels

[231, 232] führen und das dadurch erhöhte reaktive Sauerstoffspezies-(*reactive oxygen species*, ROS) Level kann zu einem Anstieg der IL-8 Sekretion führen. Dieser Anstieg der IL-8 Sekretion ist in der Literatur auch für Silberionen ([233] für hMSCs), Silbernanopartikel ([234] ebenfalls für hMSCs), Zinkoxide und Yttriumoxid [235] sowie für Nickelionen [236] bekannt. Die Sekretion von IL-8 durch hMSCs wird als eine Aktivierung der Zellen angesehen, die ihre immunomodulatorischen Fähigkeiten dadurch zum Einsatz bringen. IL-8 ist ein inflammatorisches Zytokin, was vor allem für die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zu einem Entzündungsherd verantwortlich ist. In Bezug auf die Anwendung von eisenhalten Partikeln zur Markierung von hMSCs für Magnetresonanztomographie oder Hyperthermietherapie bedeutet dies, dass auf die Untersuchung der immunomodulatorischen Fähigkeiten von hMSCs vor Freigabe solcher Partikel detailliert eingegangen werden sollte, um unerwünschte Reaktionen nach der Transplantation der Zellen zu vermeiden.

9.2.3 Einfluss der Nanopartikel auf das Differenzierungsverhalten

Die Qualität der Differenzierung unter dem Einfluss unterschiedlicher Partikel wurde mit zwei Methoden beurteilt. Zum einen wurde eine histochemische Färbung durchgeführt, die die für die jeweilige Differenzierungsrichtung spezifischen Produkte, wie Bestandteile der extrazellulären Matrix oder Lipidvakuolen, anfärbt. Auf der Transkriptionsebene wurde die Qualität der Differenzierung mittels qPCR evaluiert. Hierbei werden die Expressionslevel unterschiedlicher Differenzierungsmarker gemessen. Ausgangsmaterial der folgenden Differenzierungsversuche sind hMSCs, die vor der Induzierung der Differenzierung für 24 h mit 300 µg/mL Partikel inkubiert worden sind. Die Differenzierungszeiten variierten je nach Richtung (osteogen 23 Tage, chondrogen 24 Tage und adipogen ~4-5 Wochen). Die für die Differenzierung verwendeten Partikel wurden in Tabelle 5 beschrieben.

Die histochemischen Färbungen aller drei Differenzierungsrichtungen unter Einfluss von PS-, PS-COOH-, PLLA- und PLLA-Fe-Partikel zeigten keine Veränderung in der Ausprägung der Differenzierung (siehe Abbildung 22, differenzierter Teil). Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die ein Zeichen zunehmender Ossifizierung darstellt, kann in

allen Proben in ungefähr gleicher Menge nachgewiesen werden. Auch die Bestandteile der extrazellulären Matrix sich entwickelnder Chondrozyten und die Lipidvakuolen der Adipozyten lassen sich in allen Proben deutlich und in gleicher Ausprägung anfärben. Die Färbung der nicht differenzierten Proben (siehe Abbildung 22, nicht differenzierter Teil) zeigt in allen drei Differenzierungsrichtungen, dass unter dem Einfluss der getesteten Partikel keine durch die Partikel induzierte Differenzierung stattgefunden hat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser qualitativen Beurteilung der Differenzierung keine durch die verwendeten Partikel induzierten Unterschiede festzustellen sind. Die hMSCs sind in Anwesenheit der bioinerten Polystyrol(SDS)-Partikel als auch der bioabbaubaren PLLA-Partikel immer noch in der Lage, sich in alle drei getesteten Differenzierungsrichtungen (osteo, chondro, adipo) funktionell zu differenzieren. Für eine spätere Anwendung nanopartikelmarkierter hMSCs ist es auch wichtig, dass das Selbsterneuerungspotential auch nach Aufnahme der Partikel erhalten bleibt. Für die hier untersuchten Partikel konnte gezeigt werden, dass die Selbsterneuerung der Zellen noch vorhanden war und es zu keiner partikelinduzierten Differenzierung kam.

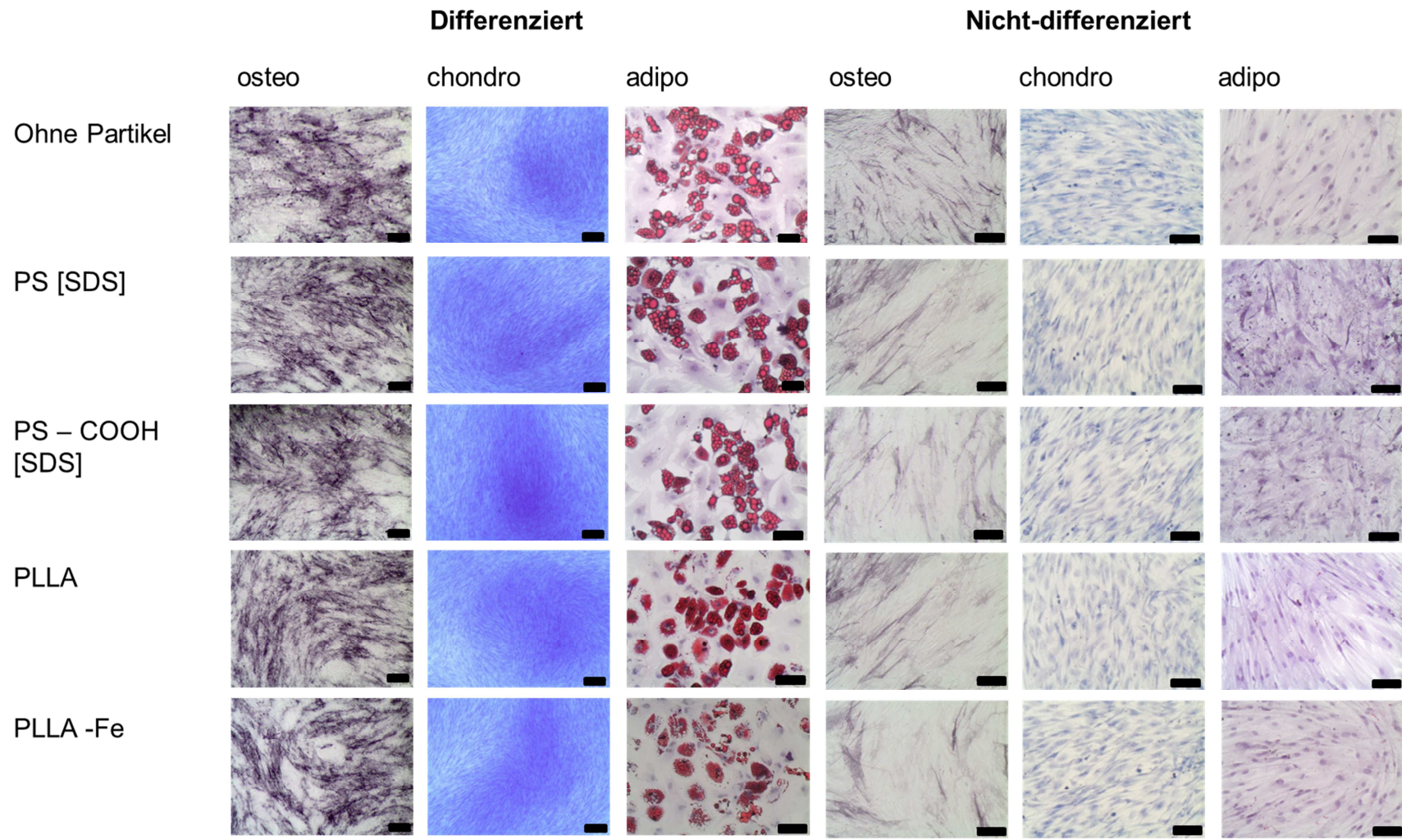


Abbildung 22: Histologischer Nachweis der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung von hMSCs unter dem Einfluss von Polystyrol (SDS)- und PLLA-NP. Der Größenbalken entspricht bei den differenzierten osteogenen und chondrogenen Proben 200 µm, bei den restlichen Proben 100 µm

Während die histochemische Analyse keine Beeinflussung der Differenzierungskapazität von hMSCs durch die verwendeten NP zeigt, zeigte die Expressionsanalyse unterschiedlicher Markergene der adipogenen und osteogenen Differenzierungsrichtung vereinzelte jedoch signifikante Veränderungen.

Die Analyse der chondrogenen Differenzierung mittels qPCR gestaltete sich sehr schwierig. Auf Grund der histochemischen Färbungen (siehe Abbildung 22) ist klar zu erkennen, dass eine chondrogene Differenzierung stattgefunden hat, dies zeigt sich jedoch nicht in den qPCR-Ergebnissen. Trotz Verwendung verschiedener Primer konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse für 4 Primerpaare für alle 4 verwendeten Partikel dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass in den differenzierten Proben keine (oder fast keine) Hochregulation der Expression stattgefunden hat, lediglich TGF β zeigt eine leichte Hochregulation um das Zweifache. Eine solch niedrige Hochregulation ist bei qPCR-Ergebnissen jedoch als nicht sehr aussagekräftig anzusehen. Die übrigen drei Primer zeigten überhaupt keine Hochregulation.

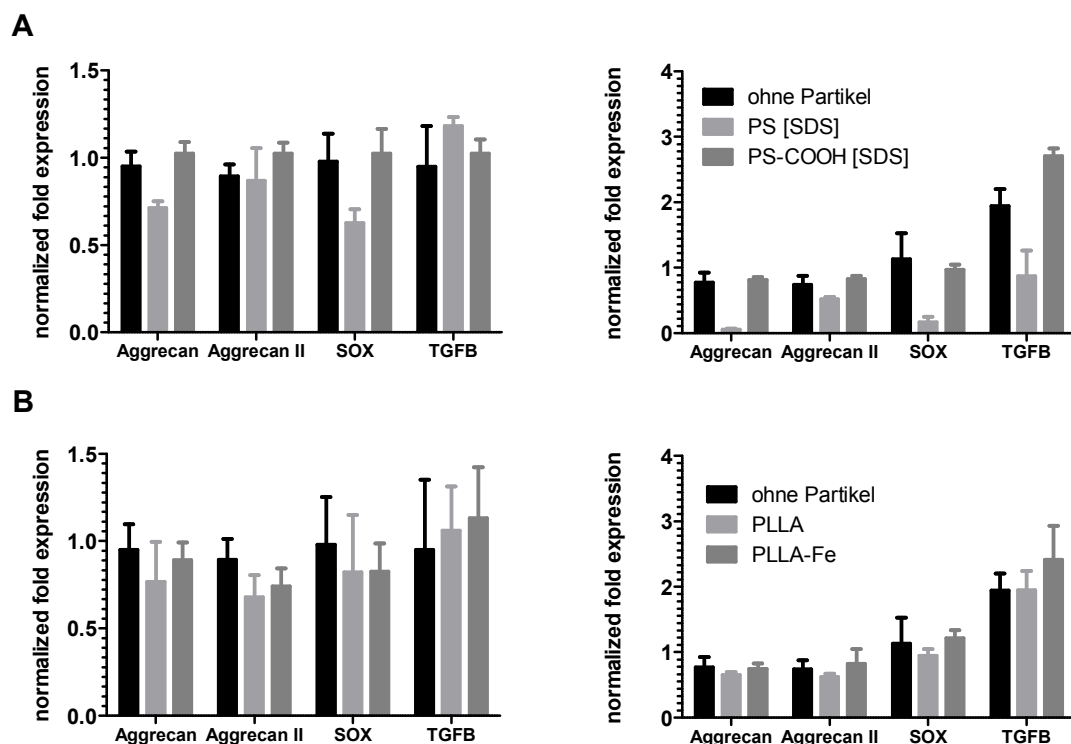


Abbildung 23: Expression unterschiedlicher chondrogener Markergene unter dem Einfluss verschiedener Nanopartikel. A: Polystyrol(SDS)-Partikel; B: PLLA-Partikel.

Wieso diese Primer alle keine deutliche chondrogene Differenzierung nachweisen, ist unklar. Obwohl auf qPCR-technischer Seite die Reaktionsbedingungen immer wieder verändert und optimiert worden sind, ist es nicht gelungen eine aussagekräftige qPCR Reaktion für diese Differenzierungsrichtung zu etablieren.

Die Analyse der Expressionslevel dreier adipogener Markergene ließ für den PS-Partikel eine signifikante Erniedrigung der Expression von FABP4 und TIMP in den nicht differenzierten Proben erkennen. In den differenzierten Proben wurde die Expression von TIMP sowohl durch den PS als auch durch den PS-COOH-Partikel signifikant erniedrigt. Das Markergen CIDE zeigte weder in den nicht-differenzierten noch in den differenzierten Proben eine Beeinflussung durch die Polystyrol-Partikel.

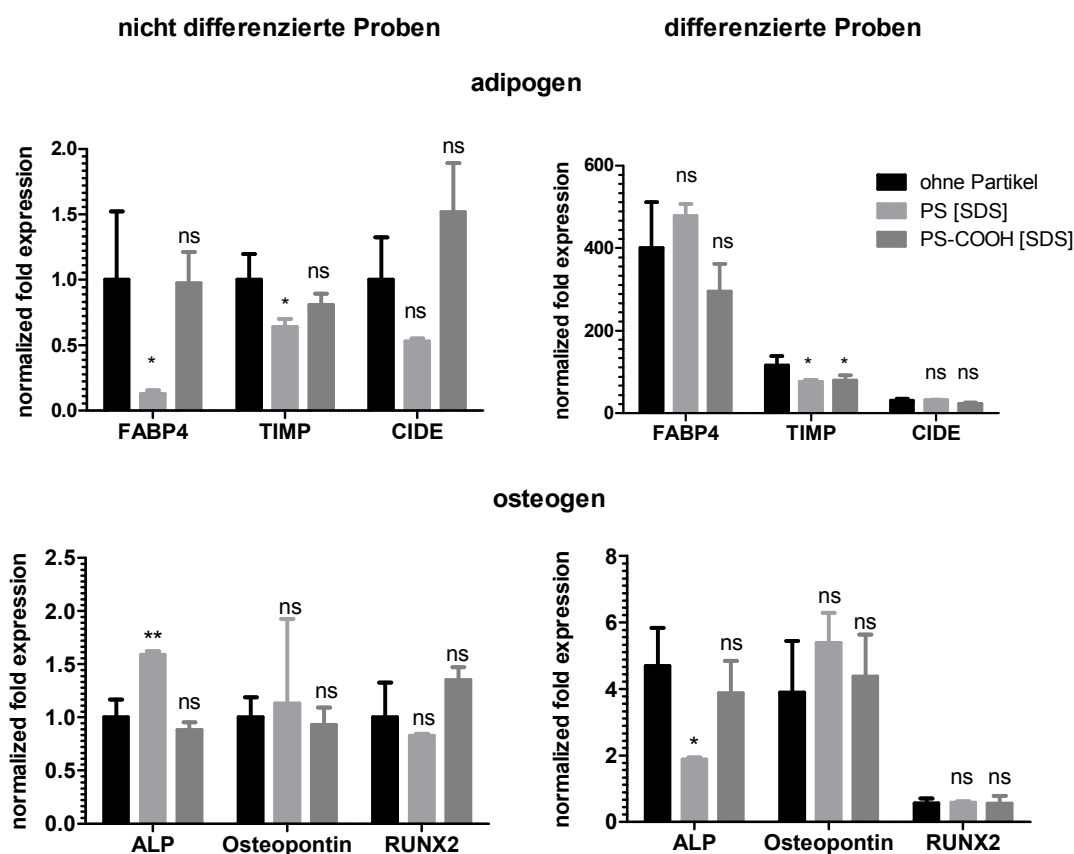


Abbildung 24: Expression unterschiedlicher hMSC-Differenzierungsmarker unter dem Einfluss von SDS stabilisierten Polystyrol-Partikeln.

Die Analyse der osteogenen Markergene ALP, Osteopontin und RUNX2 zeigte nur eine Abweichung des Expressionsprofils bei ALP unter dem Einfluss des PS Partikels, wobei hier die konträre Situation vorliegt, dass in den nicht-differenzierten Proben die Expression signifikant erhöht, in den differenzierten Proben jedoch signifikant erniedrigt

wurde. Die Expression von Osteopontin hat sich in keiner Probe signifikant verändert. Im Gegensatz zur adipogenen Differenzierung zeigt der PS-COOH-Partikel in der osteogenen Differenzierung keinerlei Einfluss auf die Expression der untersuchten Markergene. Die Ergebnisse der Expression von RUNX2 lassen keine Aussage zu, da eine Hochregulation des Markers in der differenzierten Probe nicht zu beobachten war. Dieser Marker wurde in anderen qPCR-Analysen getestet und zeigte dort eine Hochregulation in den differenzierten Proben. Wieso in diesen Differenzierungen keine Hochregulation zu beobachten ist, liegt möglicherweise an der unterschiedlichen Differenzierungsgeschwindigkeit der hMSCs. Hierbei kann die Differenzierung sich im mehrere Tage unterscheiden. Trotz der durch die histologische Färbung sichtbar stattgefundenen osteogenen Differenzierung ist es möglich, dass RUNX2 in diesen Proben noch nicht so stark hochreguliert wurde und es so zu diesen qPCR-Ergebnissen kam.

Die PLLA-Partikel zeigen in der qPCR-Analyse sowohl in der adipogenen als auch in der osteogenen Differenzierung keine signifikanten Veränderungen der Expressionslevel. Bei diesem Partikel stimmen histologische Beobachtungen und qPCR-Ergebnisse zu 100 % überein. Auch der PLLA-Fe Partikel zeigt nur einen sehr geringen Einfluss auf die Expression der untersuchten Markergene, lediglich die Expression von Osteopontin in der nicht-differenzierten Probe ist signifikant erniedrigt. Die Expression des adipogenen Markergens FABP4 unterscheidet sich bei den PLLA-Proben um den Faktor 100 im Gegensatz zu den PS-Proben. Dies ist wie auch die unterschiedliche Expression von RUNX2 durch den nicht immer komplett synchronen Differenzierungsverlauf zu erklären. Da die Proben für die qPCR-Analysen immer zum gleichen Zeitpunkt der Differenzierung gewonnen wurden, können sich je nach Versuchsansatz die Zellen in einem unterschiedlichen Stadium der Differenzierung befinden und so auch unterschiedliche Mengen an Markergenen exprimieren.

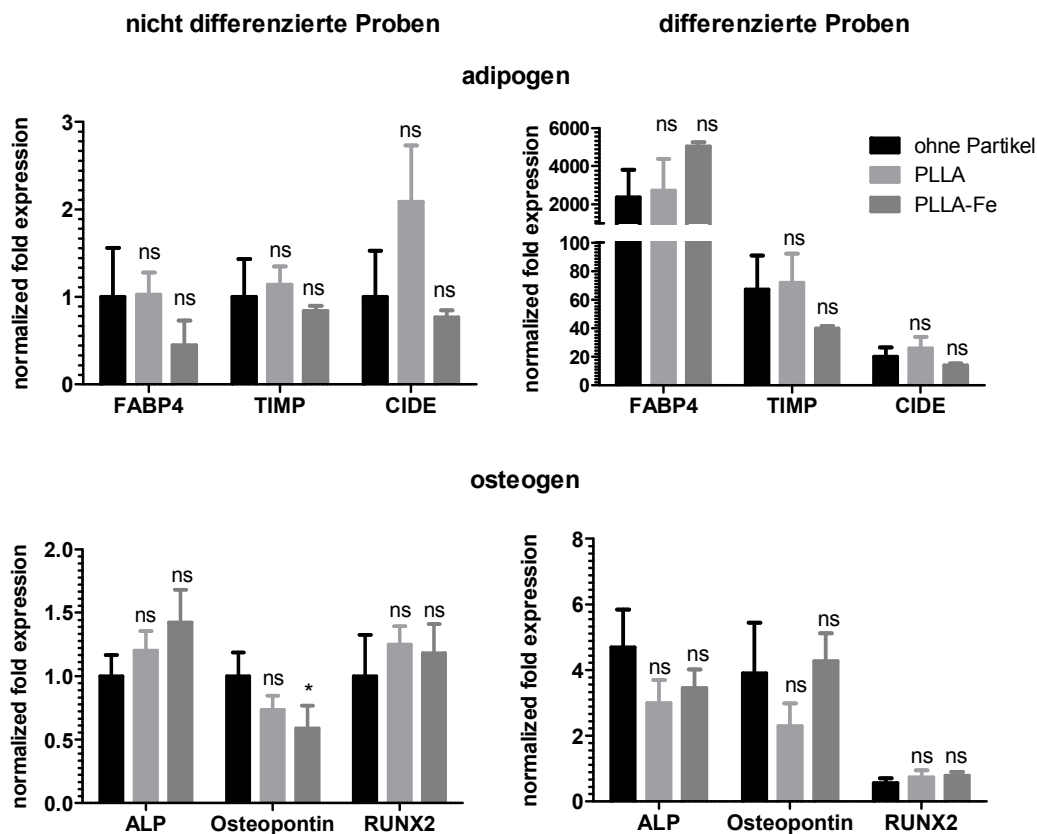


Abbildung 25: Expression unterschiedlicher hMSC-Differenzierungsmarker unter dem Einfluss von PLLA-Partikeln.

Insgesamt zeigen die getesteten Partikel einen unterschiedlichen Einfluss auf einige aber, nicht alle der untersuchten Markergene. Die Ergebnisse der histologischen Färbung zeigen, dass trotz der Veränderungen im Expressionslevel einiger Markergene die Zellen in der Lage, sind das korrekte Differenzierungsprogramm durchzuführen.

Eine Erklärung, wieso einzelne Partikel selektiv einzelne Markergene in ihrer Expression beeinflussen, gestaltet sich sehr schwierig, da der Differenzierungsprozess ein Zusammenspiel komplexer Signalwege darstellt. Die Differenzierung von hMSCs wird u.a. durch folgende Signalwege kontrolliert und gesteuert: kanonischer Wnt, TGF- β Superfamilie ^[237] oder Hedgehog ^[238, 239]. Innerhalb dieses komplexen Systems ist sehr schwierig zu klären, wo und wie die verwendeten Nanopartikel die festgestellte Expressionsänderung der Markergene verursachen. In der Literatur gibt es viele Studien über den Einfluss von verschiedenen NP auf den Differenzierungsprozess von hMSCs. Die Verwendung von unterschiedlichen Materialien und Testverfahren macht es jedoch unmöglich, die Ergebnisse untereinander zu vergleichen. Eine Studie mit Phosphonat-funktionalisierten Polystyrol-NP ^[240] zeigte, dass diese Partikel das

Differenzierungspotential von hMSCs nicht verändern. Andere Studien wurden mit mesoporösen Silikapartikeln durchgeführt ^[241]. Hierbei wurden signifikante Veränderungen in der kurzfristigen Proteinantwort und in der osteogenen Differenzierung gefunden. Für die in der Medizin als MRT-Kontrastmittel verwendeten superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel finden sich in der Literatur für die gleichen Partikel widersprüchliche Ergebnisse bezüglich ihres Einflusses auf hMSCs ^[242, 243].

Eine mögliche Form, wie NP den Differenzierungsprozess beeinflussen könnten, stellt das endosomale Signaling dar. Neuste Erkenntnisse in unterschiedlichen Zellsystemen unterstützen die These, dass Organellen eine direkte Rolle in Signalverbreitung und Amplifikation spielen ^[216]. Elektronenmikroskopische Studien über die Aufnahme polymerer Nanopartikel in unterschiedliche Zelllinien ^[244, 245] zeigen, dass diese Partikel dazu tendieren, sich in Endosomen anzusammeln. Hierdurch ist es denkbar, dass sie das endosomale Signaling und dadurch auch die Differenzierungssignalkaskade beeinflussen oder stören können. In der Literatur finden sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Hinweise, wie dieser Einfluss aussehen könnte. Um diese Punkte klären zu können, ist es notwendig, die Interaktion von Nanopartikeln und hMSCs auf molekularer Ebene genauer zu untersuchen. Der Einsatz von Micro-Array-Verfahren sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene erlaubt hierbei die eventuell beteiligten Signalwege besser zu untersuchen.

Desweiteren ist es notwendig, diese hier *in vitro* erzielten Ergebnisse *in vivo* zu validieren, um zu klären, ob die hier beobachteten Veränderungen der Genexpression auch für die medizinische Verwendung von hMSCs relevant ist. Hierbei gilt es zu klären, inwieweit welche Veränderung welcher Gene einen Einfluss auf die jeweilige therapeutische Anwendung und auf die Gesamtsituation im lebenden Organismus hat.

9.3 Interaktion von Nanopartikeln mit hHSCs [246]

In diesem Kapitel wird die Interaktion der in Kapitel 9.1 beschriebenen Nanopartikel mit hämatopoetischen Stammzellen beschrieben. Diese Stammzellen sind neben den in Kapitel 9.2 analysierten hMSCs die bestuntersuchtesten Stammzellen, die auch einen verbreiteten Einsatz in der Medizin haben (vergleiche auch Kapitel 4.3). Die Vorgehensweise der Partikel-Zell Interaktionsanalyse gleicht der in Kapitel 9.2).

9.3.1 Partikelaufnahme und Toxizität

Für die Analyse der Partikelaufnahme und der Toxizität wurden frisch aufgetaute hHSCs mit 300 µg/mL Partikeln für 24 h inkubiert und anschließend im Durchflusszytometrie analysiert. Zur Überprüfung des Partikelgehalts der Zellen während der 11 d dauernden Differenzierung wurden an 5 Zeitpunkten (d 1, d 4, d 6, d 8 und d 11) Proben für eine erneute Partikelmessung entnommen.

Auf Grund der ausgeprägten Doppelpopulationen nach 24 stündiger Partikelaufnahme war es nicht möglich, die Ergebnisse in Zahlenwerten darzustellen, stattdessen werden die Fluoreszenzintensitätshistogramme gezeigt. Die jeweiligen Partikelnahmen wurden für die drei unterschiedlichen Differenzierungsrichtungen getrennt ermittelt, da sich das Partikelverhalten innerhalb der Differenzierungsrichtungen möglicherweise unterscheidet.

Die SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel (PS und PS-COOH) zeigen nach 24 h eine deutliche Aufnahme in die hHSCs, wobei es zwei getrennte Populationen gibt, die sich in ihrem Partikelgehalt deutlich unterscheiden (siehe Abbildung 26 graue Kurve). Innerhalb der durchflusszytometrischen Analyse war es nicht möglich zu klären, wieso zwei getrennte Populationen mit so deutlich unterschiedlichen Aufnahmeverhalten existieren. Denkbar ist, dass sich die jeweiligen Populationen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befunden haben und dadurch die Partikelaufnahme so unterschiedlich ausfällt. Eine Korrelation mit dem Differenzierungsstatus und dem Partikelgehalt konnte nicht gefunden werden.

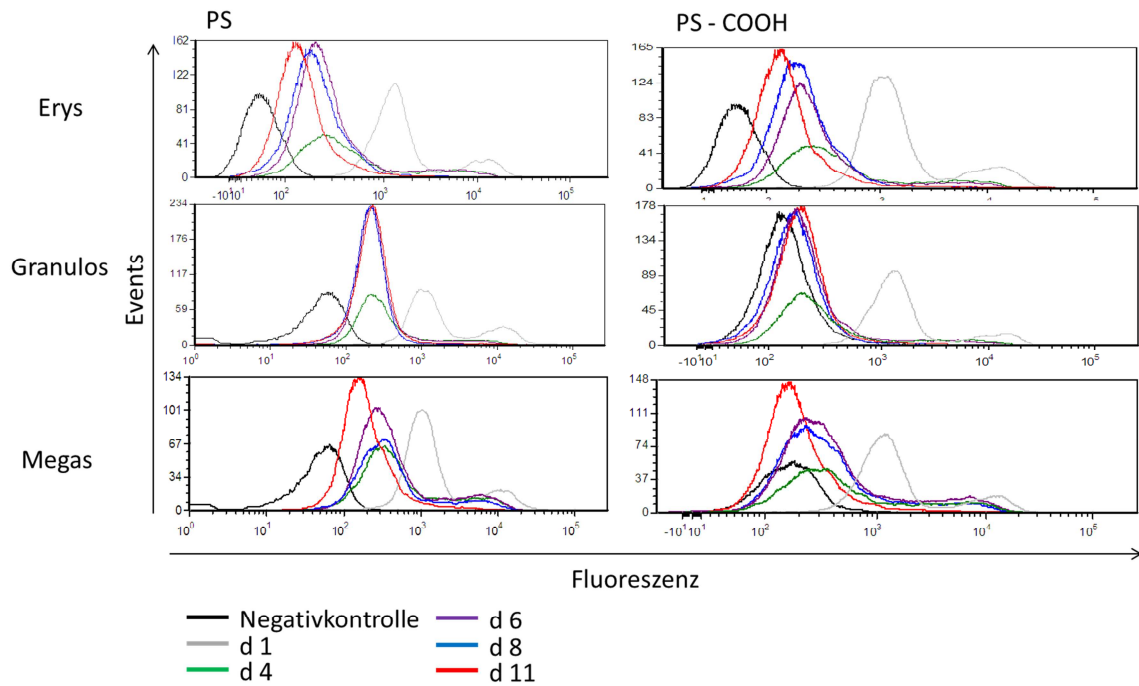


Abbildung 26: Kinetik der Aufnahme unterschiedlicher SDS-stabilsierter Polystyrol-Partikel in hHSCs nach 24 h Inkubation mit 300 µg/mL Partikel.

Über die Zeit der Differenzierung nimmt die Partikelmenge deutlich ab, wobei sich die Restpartikelmenge je nach Differenzierungsrichtung und Partikel unterscheidet. Bei den Granulos und Megas ist die verbleibende Partikelmenge für den PS-COOH-Partikel deutlich geringer als die des PS-Partikels (vergleiche Abbildung 26) und an Tag 11 so gut wie nicht mehr vorhanden, für die Erys unterscheiden sich die Partikel in ihrem Verhalten nicht. Die Doppelpopulation bleibt auch über weite Strecken der Differenzierung erhalten, wobei die stärker fluoreszierende Population kontinuierlich abnimmt. Eine mögliche Erklärung für die starke Abnahme des Partikelgehalts der Zellen ist die hohe Teilungsrate, die mit den jeweiligen Differenzierungen einhergeht. Dadurch wird der verringerte Partikelgehalt pro Zelle durch simple Verdünnungseffekte bei der Zellteilung (das vorhandene Zytoplasma und die darin enthaltenen Vesikel mit Partikeln wird auf zwei Zellen aufgeteilt) hervorgerufen. Hierbei unterscheiden sich die hHSCs deutlich von den hMSCs, die sich während ihrer Differenzierung nicht mehr so stark teilen und dadurch am Ende der Differenzierung eine höhere Partikelbeladung aufweisen können als die hHSCs.

Die Annahme, der Hauptteil der Partikel könnte nach 24 h nur an die Zellmembran angelagert und nicht in die Zelle aufgenommen worden sein, wurde durch cLSM-

Aufnahmen (Abbildung 27) nicht bestätigt. Die cLSM-Bilder zeigen deutlich, dass alle 4 getesteten Partikel nach 24 h in die Zellen aufgenommen wurden und sich keine Partikel auf den Zellmembranen befinden. Die Beladungsdichte der Zellen ist im Vergleich zu anderen Zellsorten wie hMSC oder HeLa geringer. Deutlich zeigen die cLSM-Aufnahmen auch den im Durchflusszytometrie beobachteten Trend, dass die PLLA-Partikel deutlich besser aufgenommen wurden als die SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel.

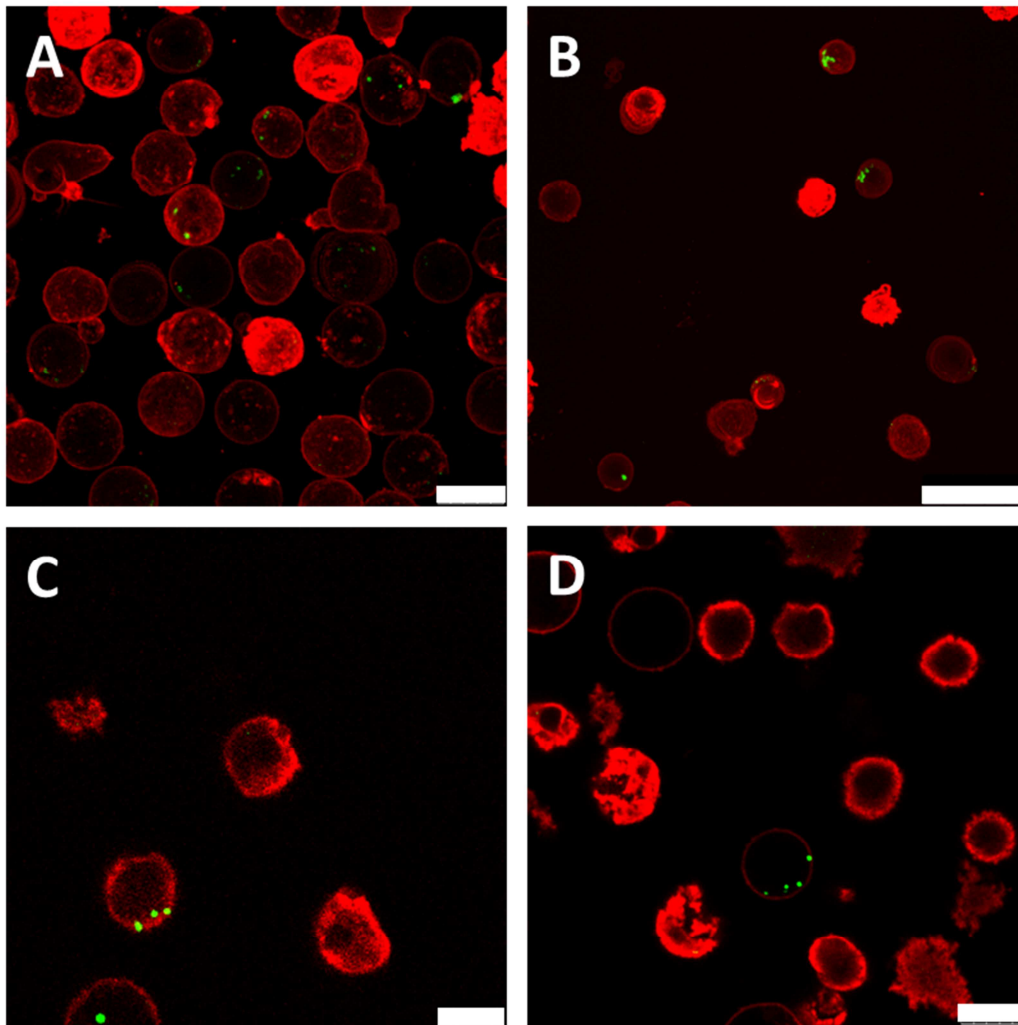


Abbildung 27: Nachweis der Partikelaufnahme von hHSCs nach 24 h Inkubation mit 300 µg/mL Nanopartikeln mit Hilfe von cLSM-Aufnahmen. Die Zellmembran ist in Rot dargestellt, die Nanopartikel in Grün. A: PS (SDS); B: PS-COOH (SDS); C: PLLA; D: PLLA-Fe. A und B sind Maximumprojektionen von 25 Ebenen. Der Größenbalken repräsentiert 25 µm.

Im Gegensatz zu hMSCs (siehe Kapitel 9.2.1) zeigen hHSCs keine vermehrte Aufnahme von carboxylfunktionalisierten PS-Partikeln im Vergleich zu nicht-funktionalisierten Polystyrol-Partikeln. Eine absolute quantitative Aussage über das Aufnahmeverhalten dieser zwei Partikel ist auf Grund der oben beschriebenen deutlich ausgeprägten

Doppelpopulationen nicht möglich; trotzdem ist die Aussage, dass die Funktionalisierung nicht zu einer erhöhten Partikelaufnahme führt, möglich. Eine genaue Erklärung, wieso der positive Effekt der COOH-Gruppen auf der Partikeloberfläche bei den hHSCs nicht zu beobachten ist, ist ohne weitere Untersuchungen nicht möglich. Da über die Aufnahmemechanismen von hHSCs noch nicht sehr viel bekannt ist, ist es denkbar, dass die hHSCs andere Aufnahmemechanismen als hMSCs oder HeLa-Zellen für die Polystyrol-Partikel verwenden. Für aminofunktionalisierte Polystyrol-Partikel wurde das Phänomen der unterschiedlich guten Aufnahme in verschiedene Zelllinien auch beobachtet. So zeigen hMSCs nur eine um ca. das 6-fach erhöhte Aufnahme von aminofunktionalisierten Polystyrol-Partikeln im Vergleich zu nicht funktionalisierten Polystyrol-Partikeln, während HeLa-Zellen eine bis zu 45-fach erhöhte Aufnahme zeigen [245].

Die Zellaufnahme der PLLA- und PLLA-Fe-Partikel zeigt ein ähnliches Bild wie die der SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel. Auch hier nimmt die Partikelbeladung der Zellen während des Differenzierungsvorgangs deutlich ab (siehe Abbildung 28), jedoch ist die Partikelaufnahme nach 24 h deutlich höher als bei den Polystyrol-Partikeln und an Tag 11 ist immer noch eine deutliche Partikelaufnahme in die Zellen zu erkennen. Bei den PLLA- und PLLA-Fe-Partikeln verhalten sich Erys und Granulos in ihrem Aufnahmeverhalten gleich, bei den Megas ist für beide Partikel die Endbeladung der Zellen niedriger und hier tritt eine ausgeprägtere Doppelpopulation auf als bei den anderen beiden Differenzierungsrichtungen (vergleiche Abbildung 28).

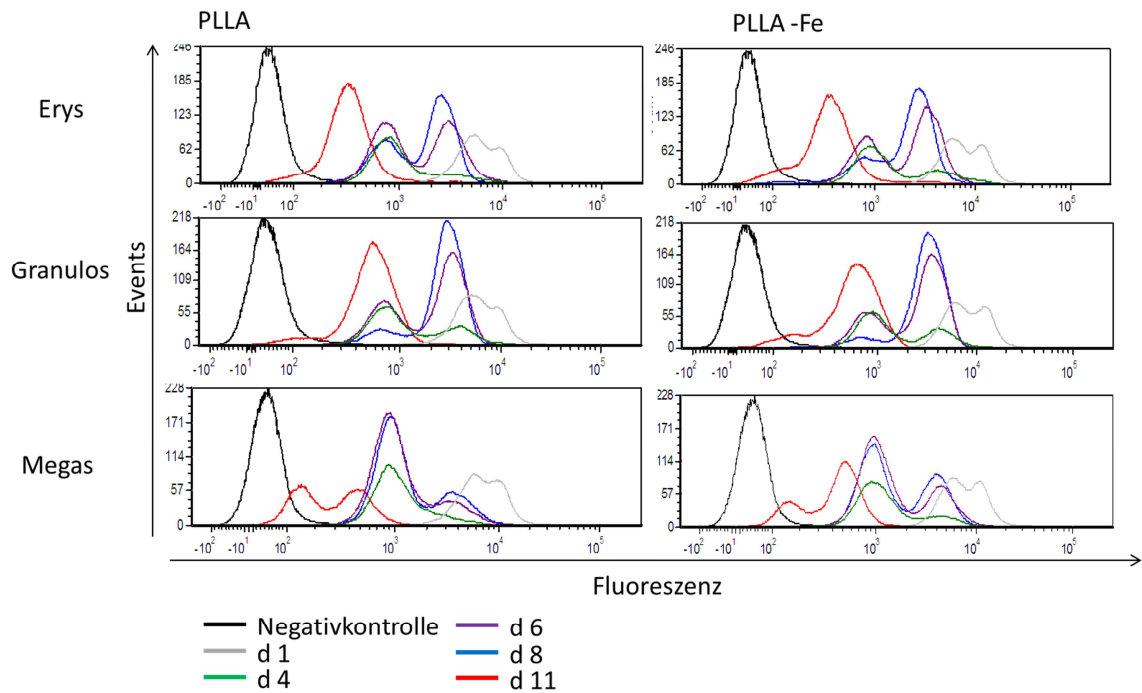


Abbildung 28: Kinetik der Aufnahme unterschiedlicher PLLA-Partikel in hHSCs nach 24 h Inkubation mit 300 µg/mL Partikeln.

Wie auch schon bei den Polystyrol-Partikeln konnte auch bei den PLLA-Partikeln keine Erklärung für die im Partikelauftnahmegramm erkennbaren Doppelpopulationen gefunden werden. Die Vermutung, dass es sich bei den beiden Populationen um differenzierte und nicht differenzierte Zellen handelte, konnte nicht bestätigt werden. Identisch zu den Ergebnissen der hMSCs zeigen auch hier die PLLA- und PLLA-Fe-Partikel keinen Unterschied in ihrer Aufnahme, somit wird die Aufnahme durch das in den Partikeln enthaltene Magnetit nicht beeinflusst.

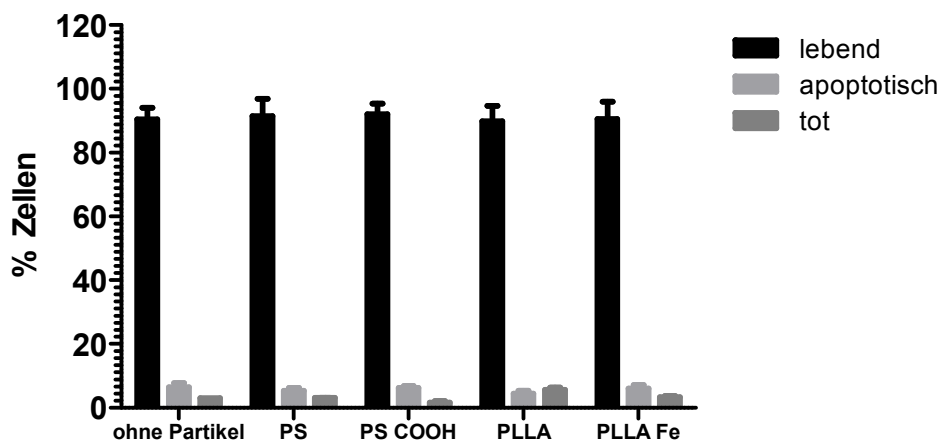


Abbildung 29: Toxizität unterschiedlicher Nanopartikel nach 24 stündiger Inkubation mit 300 µg/mL Partikeln.

Die Analyse der Partikeltoxizität (vergleiche Abbildung 29) ergab keine toxische Wirkung der verwendeten Partikel. Weder die apoptotische noch die tote Zellpopulation ist unter Partikeleinwirkung angestiegen. Hierbei zeigen die hHSCs ein identisches Bild zu den hMSCs. Für diese Zellen konnte auch keine durch die verwendeten Partikel verursachte Toxizität festgestellt werden. Somit eignen sich beide Materialien (Polystyrol und PLLA) sowie eine Oberflächenfunktionalisierung oder eine Magnetitbeladung aus toxikologischer Sicht für die Anwendung bei diesen beiden Stammzellsorten. Die bioabbaubaren PLLA-Partikel sind besonders auf Grund der hohen Biokompatibilität ihrer Abbauprodukte für einen medizinischen Einsatz geeignet. PLLA-Partikel werden in Zellen zu Milchsäure abgebaut, diese wird in den Citratzyklus eingeschleust und dort metabolisiert. Die Zelle wird in ihrer Funktionalität durch diesen Abbau nicht gestört.

9.3.2 Zytokinsekretion

Zur Überprüfung der zellulären Funktion unter Partikeleinfluss wurde die Sekretion von IL-8 nach 24 stündiger Partikelinkubation mit 300 µg/mL Partikeln untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Einfluss der Partikel auf die IL-8 Sekretion beobachtet werden (siehe Abbildung 30). Allgemein war das Level der IL-8 Ausschüttung sehr niedrig. Eine bei den hMSCs beobachtete Erhöhung des IL-8 Levels durch den PLLA-Fe-Partikel konnte bei den hHSCs nicht festgestellt werden.

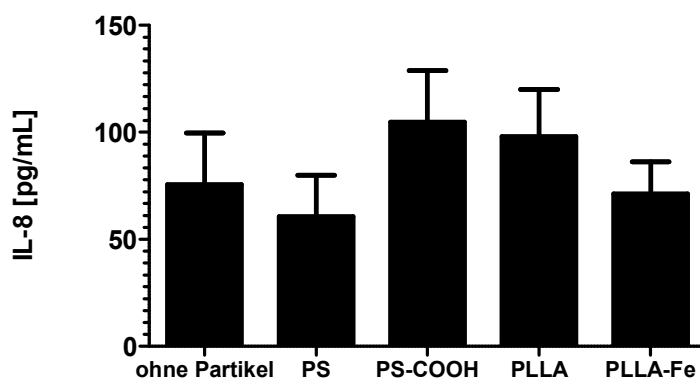


Abbildung 30: IL-8 Sekretion von hHSCs nach 24 h Inkubation mit 300 µg/mL Partikeln. Die Partikel verursachen keine signifikante Veränderung des Sekretionsprofils.

hHSCs scheinen hierbei einen anderen Triggermechanismus für die IL-8 Sekretion zu besitzen oder sie sind gegenüber erhöhtem oxidativen Stress-Level toleranter.

9.3.3 Differenzierungsverhalten unter Nanopartikel Einfluss

Analog zu den hMSC-Versuchen wurde auch bei den hHSCs die Qualität der Differenzierung unter dem Einfluss unterschiedlicher Partikel mit zwei Methoden beurteilt. Wie auch schon bei den hMSCs wurde die Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker mittels qPCR quantitativ analysiert. Neben einer histologischen Färbung wurde die Expression von linienspezifischen Zelloberflächenmarkern (*Cluster of differentiation*, CD-Marker) mit Hilfe entsprechender fluoreszenzmarkierter Antikörper im Durchflusszytometer untersucht.

Die Überlagerung der einzelnen Antikörperhistogramme zeigt, dass weder der SDS-stabilisierte PS- noch der SDS-stabilisierte PS-COOH-Partikel zu einem Expressionsunterschied der untersuchten CD-Marker führt (vergleiche Abbildung 31). Die nicht differenzierte Probe (schwarze Kurve in Abbildung 31) zeigte für alle analysierten CD-Marker eine sehr geringe oder nicht vorhandene Expression. Dies zeigt eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen an. Die grauen Isotypkontroll-Kurven zeigen, dass die gemessene Antikörperbindung auf eine spezifische Antikörperreaktion zurückgeht.

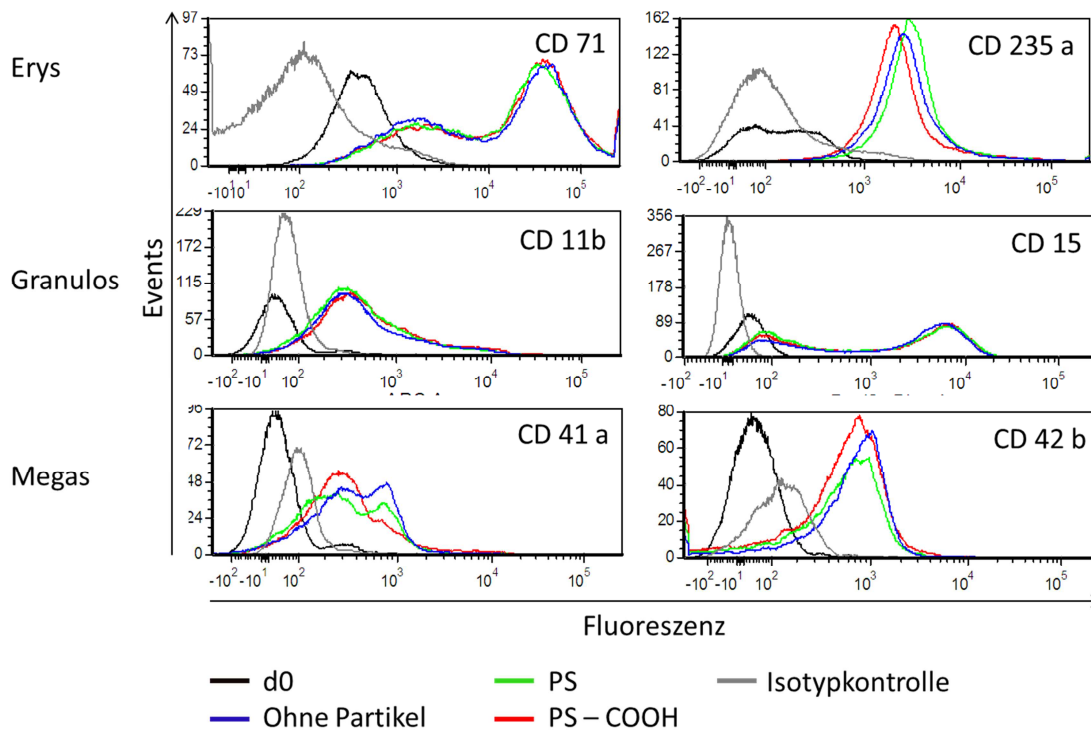


Abbildung 31: CD-Marker Färbung zum Nachweis der hHSC-Differenzierung unter Einfluss von SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikeln.

Auch für die PLLA- und PLLA-Fe-Partikel konnte kein signifikanter Expressionsunterschied für die einzelnen Differenzierungsmarker gezeigt werden (Abbildung 32).

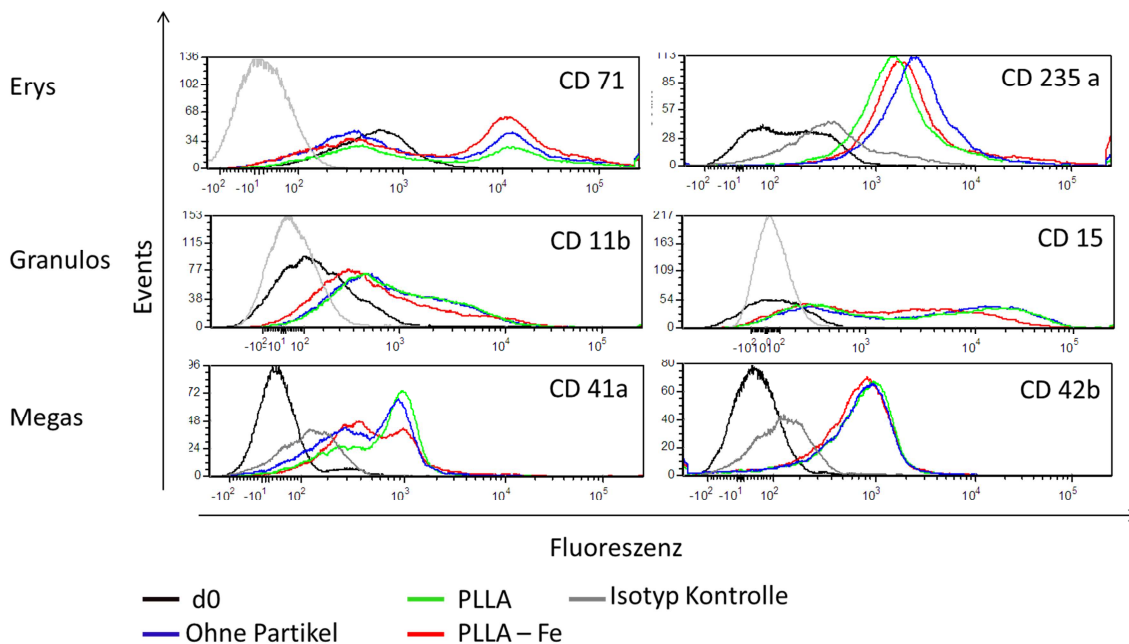


Abbildung 32: CD-Marker Färbung zum Nachweis der hHSC Differenzierung unter dem Einfluss von PLLA-Partikeln.

Somit konnte auf Ebene der CD-Marker-Expression keine durch die Partikel induzierte Veränderung festgestellt werden.

Als zusätzliche Methode, um die Differenzierung zu bestimmen, wurde eine Pappenheim-Färbung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine histologische Färbung, durch die die einzelnen Blutzellen in unterschiedlichen Violett- und Blautönen dargestellt werden. Dies ermöglicht eine morphologische Beurteilung der Zellen

Bei den Bildern der Pappenheimfärbung (Abbildung 33) können lediglich bei der granulozytären Differenzierung einige Zellen klar als differenziert identifiziert werden (Abbildung 33 schwarze Pfeile). Da die Aussagekraft dieser histologischen Färbung in Bezug auf möglichen Partikeleinfluss auf die Differenzierung nicht sehr stark war, wurde diese Färbung nicht für alle Partikel durchgeführt.

.

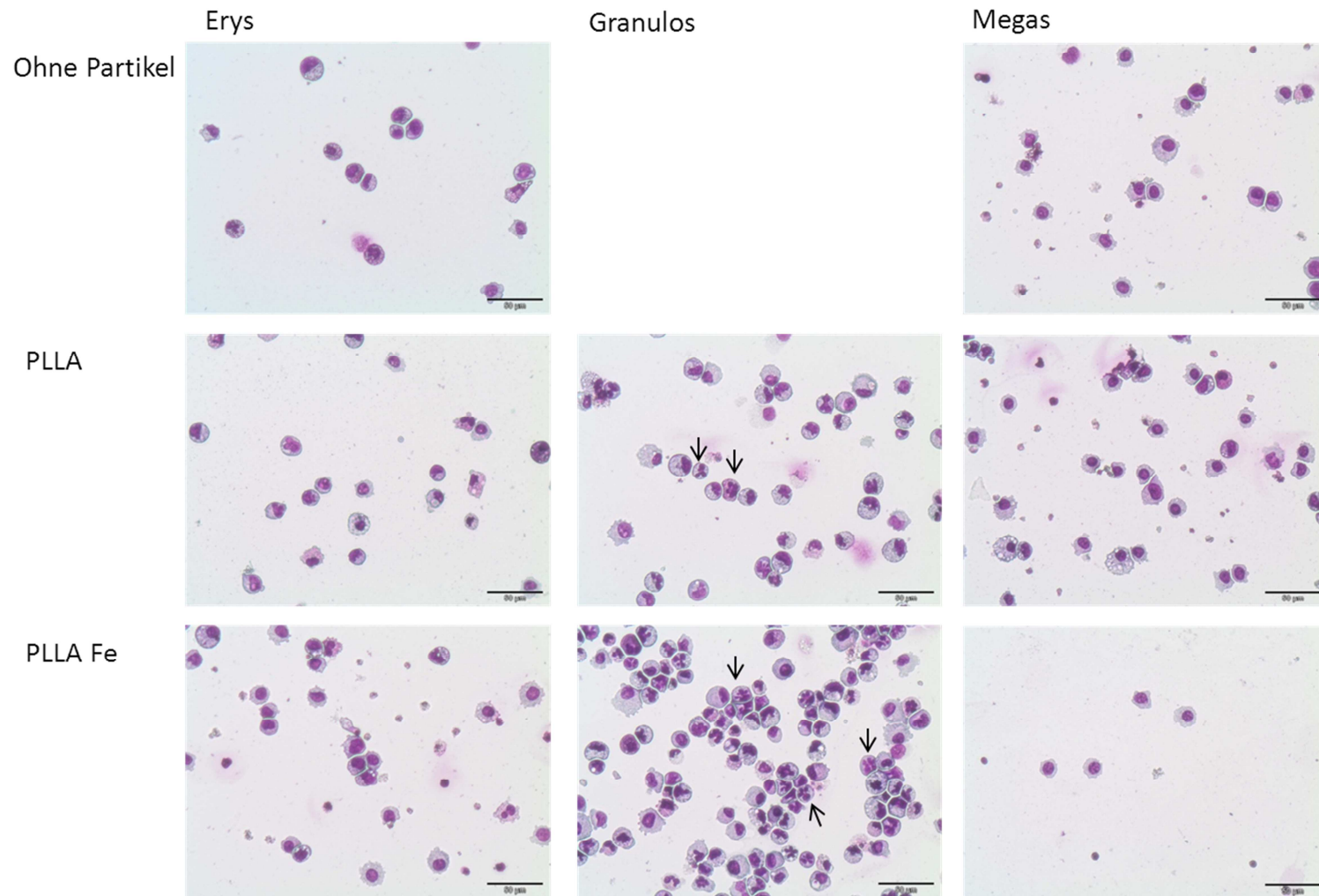


Abbildung 33: Pappenheimfärbung von hHSCs nach 11 Tagen Differenzierung. Der Größenbalken repräsentiert 50 μm . Die granulozytäre Probe ohne Partikel ist während der Probenpräparation verloren gegangen. Pfeile markieren eindeutig differenzierte Zellen.

Die quantitative Analyse der hHSC-Differenzierung mittels qPCR ergab ein ähnliches Bild wie bei den hMSCs.

Die Polystyrol-Partikel zeigen in allen drei untersuchten Differenzierungsrichtungen signifikante Unterschiede in der Expression, jedoch nicht für alle Differenzierungsmarker. Zu beachten gilt, dass nicht alle verwendeten Differenzierungsmarker auch in nicht-differenzierten hHSCs (d0) exprimiert werden. In diesen Fällen wurde die Expression der Probe ohne Partikel auf 1 gesetzt und die relative Genexpression berechnet.

Der SDS-stabilisierte PS-Partikel führt nur bei ILRA, einem granulozytären Marker, zu einer signifikanten Expressionserhöhung, die anderen untersuchten Marker werden durch diesen Partikel nicht beeinflusst (Abbildung 34). Der SDS-stabilisierte PS-COOH-Partikel hingegen zeigt sowohl für Glycophorin A (Erys) als auch für TREM (Megas) und beide granulozytären Marker einen signifikanten Expressionsunterschied, wobei alle Marker bis auf CEACAM (Granulos) in ihrer Expression erhöht werden.

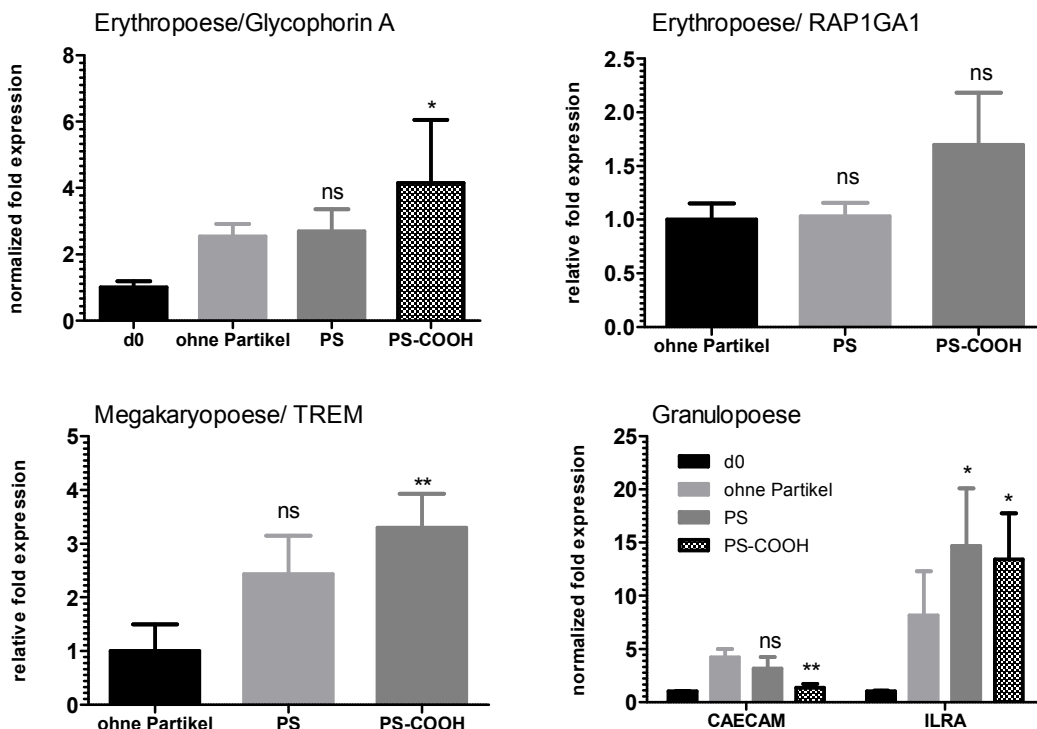


Abbildung 34: Expression unterschiedlicher hämatopoetischer Differenzierungsmarker unter Einfluss von Polystyrol-Partikel nach 11 Tagen Differenzierung.

Die PLLA-Partikel zeigen keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Differenzierungsmarker (Abbildung 35). Die PLLA-Fe-Partikel zeigen jedoch teilweise sehr deutliche Einflüsse. Während die Expression von Glycophorin A (Erys) signifikant erhöht wird, werden beide granulozytären Marker extrem runterreguliert.

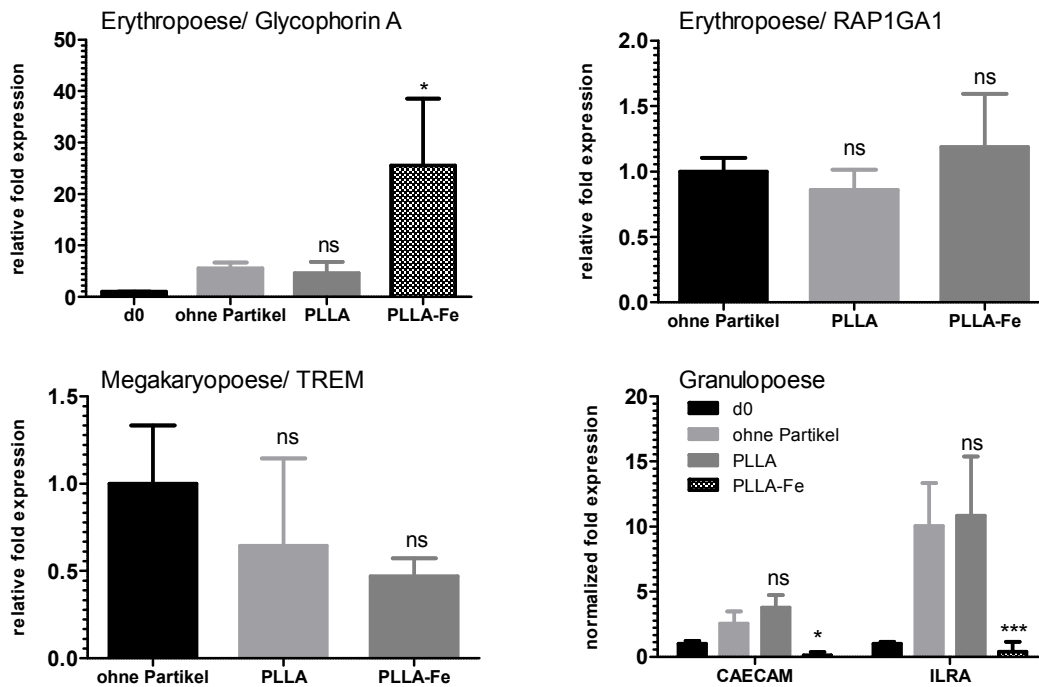


Abbildung 35: Expression unterschiedlicher hämatopoetischer Differenzierungsmarker unter Einfluss von PLLA-Partikel nach 11 Tagen Differenzierung.

Die qPCR-Ergebnisse zeigen für die erythropoetische Differenzierung von der CD-Marker Färbung abweichendes Ergebnis. In beiden Fällen wurde Glycophorin A (CD235a) untersucht, während auf der Proteinebene (CD-Marker-Analyse) jedoch keine Veränderungen zu erkennen waren, zeigt die Analyse auf RNA Ebene sowohl für den PS-COOH als auch für den PLLA-Fe-Partikel eine signifikante Erhöhung der Expression. Das Phänomen nicht korrelierender mRNA- und Protein-Daten ist in der Literatur bekannt und auch explizit untersucht worden [247, 248], wobei beide Arbeiten deutlich hervorheben, dass mRNA- und Proteinexpression durch eine Vielzahl von zellulären und physikalischen Prozessen beeinflusst werden und dadurch widersprüchliche Ergebnisse zustande kommen können. Somit muss die mRNA Expression nicht zwingend die Proteinexpression widerspiegeln. Hiermit könnte auch erklärt werden, wieso trotz signifikanter Expressionsveränderungen auf RNA Ebene die jeweiligen Differenzierungen immer noch zu funktionsfähigen differenzierten Zellen führen.

Eine Erklärung, wieso einzelne Partikel nur einzelne Differenzierungsmarker in ihrer Expression verändern, ist bei den hHSCs noch schwerer als bei den hMSCs. Während eine Vielzahl von Studien über die Differenzierung von hMSCs mit Nanopartikel existiert, ist die hHSC-Differenzierung unter Partikeleinfluss noch nicht häufig untersucht. In der Literatur finden sich vor allem hHSC-Aufnahmestudien mit eisenhaltigen Partikeln zur Markierung für MRT Aufnahmen. Für das MRT-Kontrastmittel Feridex® (Eisenoxid mit einer Dextranhülle) konnte in unterschiedlichen Studien sowohl eine gute Zellaufnahme, keine Toxizität sowie eine nicht beeinflusste Differenzierungsfähigkeit festgestellt werden [176, 178, 249]. Auch für andere MRT-Markierungssubstanzen konnte eine Zellaufnahme in CD34⁺ Zellen gezeigt werden. Die intrazelluläre Lokalisation war hierbei auf das Zytoplasma oder sekundäre Lysosomen beschränkt [250]. Eine Studie mit unterschiedlichen anorganischen Partikeln in verschiedenen Größen zeigte sowohl eine ausgeprägte Toxizität für einige Partikel (Cobalt, Antimonoxid), als auch einen negativen Einfluss auf die Differenzierung [251].

Ein Vergleich der hMSC- und hHSC-Ergebnisse zeigt, dass sich die zwei unterschiedlichen Stammzellen den vier untersuchten Partikeln gegenüber ähnlich verhalten. Beide Stammzellarten nehmen alle untersuchten Partikel in akzeptablem Maße auf, wobei diese Aufnahme nie zu einer erhöhten Toxizität führt. Für die hHSCs konnte zudem festgestellt werden, dass sich die Partikelmenge während der Differenzierung drastisch reduziert. Dies wurde für hMSCs nicht untersucht. Aus anderen Arbeiten ist jedoch bekannt, dass in hMSCs Partikel über einen relativ langen Zeitraum hinweg nachgewiesen werden können. Auch in ihrem Differenzierungsverhalten unter Partikeleinfluss ähneln sich beide Stammzellarten und zeigen auf funktioneller Ebene keine Veränderung, während die qPCR-Analyse sowohl für hMSCs als auch für hHSCs eine signifikante Beeinflussung einzelner Markergene gezeigt hat.

9.4 Einfluss unterschiedlicher BMP-2 Peptide auf das Differenzierungsverhalten von hMSCs

In diesem Kooperationsprojekt mit der Gruppe von Dr. del Campo (MPI für Polymerforschung) wurde die Auswirkung unterschiedlicher Peptidsequenzen aus dem BMP-2 Protein auf die osteogene Differenzierung untersucht. Die beiden Peptidsequenzen stammen aus unterschiedlichen aktiven Zentren des BMP-2, die mit den beiden bekannten Rezeptoren interagieren können. Die Peptide wurden jeweils einzeln, in Kombination und in einer durch einen PEG-Linker verbundenen Version (gekoppelte Peptide) untersucht. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Wirkung von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung dosisabhängig ist, wurden die Peptide ausgehend von einem Literaturwert von BMP-2 (22,7 pmol/mL= 100 ng/mL) in einer 10-fachen Verdünnungsreihe in ihrer Wirkung auf die osteogene Differenzierung von hMSCs getestet. Untersucht wurde hierbei, ob die alleinige dauerhafte Zugabe der Peptide während des Differenzierungszeitraums schon eine osteogene Differenzierung initiieren kann (nicht differenzierte Proben in α -MEM kultiviert) oder ob die zusätzliche Gabe dieser Peptide zu einem kommerziellen Differenzierungsmedium ohne BMP-2 eine erhöhte osteogene Differenzierung liefert (differenzierte Proben in NH Osteodiff Medium kultiviert). Die Peptidzugabe erfolgte in beiden Fällen zeitgleich zum zweimal wöchentlichen Mediumwechsel. Innerhalb dieser Experimente diente BMP-2 in einer Konzentration von 227 pmol/mL als Positivkontrolle.

Die Proben der einzelnen Peptide in den nicht differenzierten Proben zeigten alle keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der osteogenen Markergene Alkalische Phosphatase, Osteopontin und RUNX2 (vergleiche Abbildung 36). Das Expressionslevel änderte sich durch die Anwesenheit dieser Peptide auch in hohen Konzentrationen überhaupt nicht. Die kombinierte Gabe beider Peptide führte im Fall von Osteopontin und RUNX2 ebenfalls zu keiner Veränderung in allen Konzentrationsbereichen. Die Expression der Alkalischen Phosphatase wurde durch alle bis auf die niedrigste Konzentration signifikant erniedrigt, in der niedrigsten Konzentration wurde die Expression auch erniedrigt, jedoch ist der Wert nicht signifikant. Auch die Verbindung

beider Peptide mit Hilfe einer PEG-Sequenz (gekoppelte Peptide) zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der osteogenen Marker.

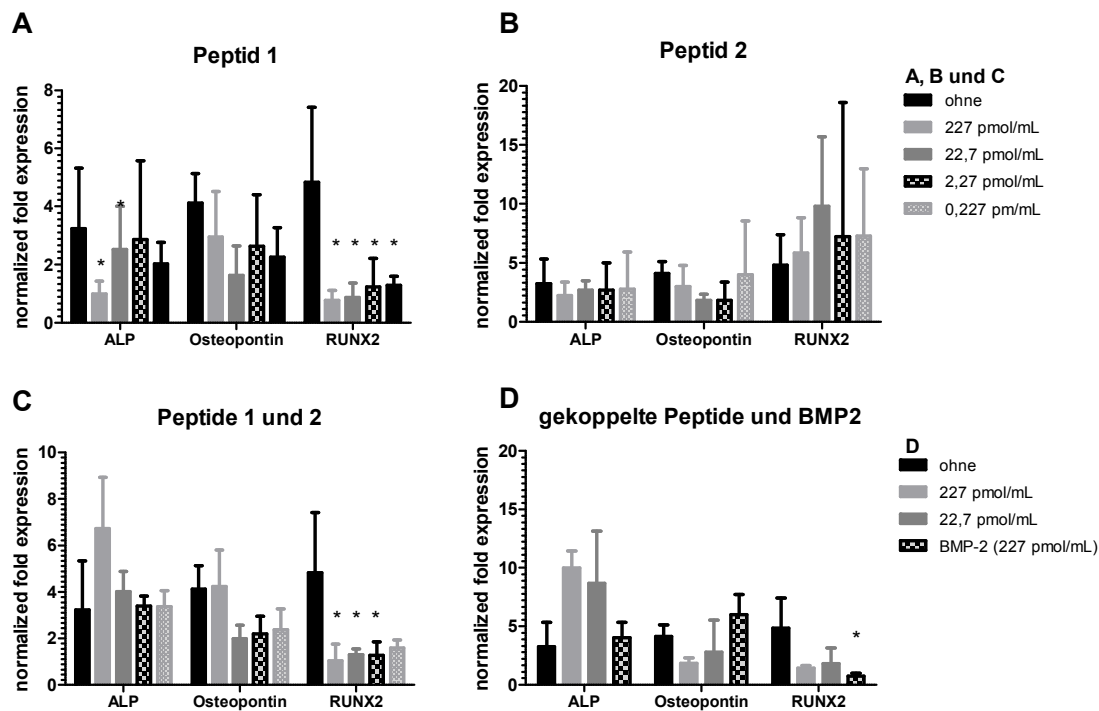


Abbildung 36: Auswirkung unterschiedlicher BMP-2 Peptide auf das osteogene Differenzierungsverhalten von hMSCs, welche 23 Tage in α -MEM kultiviert wurden (nicht differenzierte Proben).

Die Positivkontrolle BMP-2 führt sowohl im Fall der Alkalischen Phosphatase und im Fall von Osteopontin zu einer starken Erhöhung der Expression, die jedoch nur im Fall von Osteopontin signifikant ist. Die Expression von RUNX2 wird durch die Anwesenheit von BMP-2 jedoch nicht beeinflusst. Insgesamt zeigt die Positivkontrolle, dass der Versuch so funktioniert, die verwendeten BMP-2 Peptide jedoch nicht die erhoffte Wirkung auf die osteogene Differenzierung zeigen. Denkbar ist, dass die gewählten Sequenzen zu kurz sind oder sich isoliert aus ihrem Protein nicht mehr in die für die Rezeptorinteraktion wichtige Konformation falten können. Die Struktur einer Sequenz innerhalb eines aktiven Zentrums eines Proteins wird häufig durch angrenzende oder weiter entfernte Sequenzen bestimmt, dies ist bei einer isolierten Peptidsequenz nicht mehr gegeben.

Innerhalb der differenzierten Proben zeigen die Proben ohne Peptid eine deutliche Erhöhung der Expression der osteogenen Marker. Eine erfolgreiche osteogene Differenzierung hat also stattgefunden. Peptid 1 zeigt in allen Konzentrationsbereichen für RUNX2 eine signifikante Erniedrigung der Expression und in der höchsten

Konzentration auch bei der Alkalischen Phosphatase, die Expression von Osteopontin und den restlichen Proben der alkalischen Phosphatase zeigen keinen signifikanten Unterschied zur nicht behandelten Probe. Die Anwesenheit von Peptid 2 führt in allen verwendeten Konzentrationen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression. Auch die Kombination beider Peptide zeigt keine positive Wirkung auf die Expression, wie auch schon bei Peptid 1 wird die Expression von RUNX2 signifikant verringert. Die gekoppelte Version der Peptide führt bei der Expression der Alkalischen Phosphatase zu einer Erhöhung, die sich jedoch als nicht signifikant darstellt. Die Expression der Markergene Osteopontin und RUNX2 wird eher herabgesetzt, wobei auch diese Werte nicht signifikant sind.

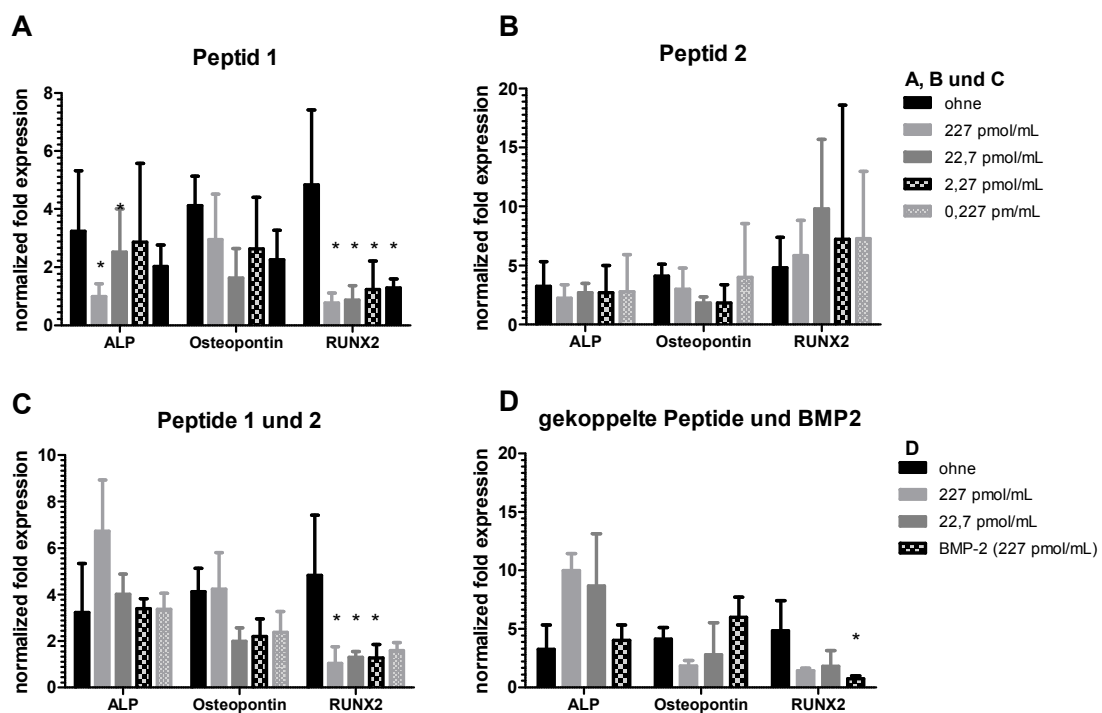


Abbildung 37: Einfluss unterschiedlicher BMP-2 Peptide auf das osteogene Differenzierungsverhalten von hMSCs, welche 23 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert worden sind (differenzierte Proben).

Die Positivkontrolle zeigt im Fall der differenzierten Proben keine Hochregulation gegenüber der unbehandelten Probe, jedoch war dies bei den differenzierten Ansätzen auch nicht unbedingt zu erwarten. Das verwendete kommerziell erhältliche Differenzierungsmedium ist von Haus aus auf eine optimale Differenzierungsleistung ausgerichtet. Diese wird dann vermutlich auch durch eine Zugabe von BMP-2 nicht noch verstärkt. Da jedoch im Voraus nicht klar war, ob die verwendeten Peptide eventuell

auch auf die differenzierten Proben einen Einfluss zeigen, wurde dieser Ansatz mit durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendeten Peptidsequenzen in ihrer jetzigen Form nicht für eine Förderung oder Induzierung einer osteogenen Differenzierung geeignet sind.

9.5 Markierung von Zellen für eine Darstellung im MRT

Das immer größer werdende Potential von Zelltherapien erfordert nicht-invasive Methoden, um den Verbleib dieser Zellen im Körper zu verfolgen und somit die Behandlung zu optimieren. Hierbei ist vor allem die Magnetresonanztomographie (MRT) das Mittel der Wahl, da so nicht-invasiv und in Echtzeit die Biodistribution, die Wanderung der Zellen und ihre Differenzierung verfolgt werden können. Um Zellen im MRT sichtbar zu machen, werden diese mit unterschiedlichen Nanopartikeln markiert, die einen Effekt auf den MRT Kontrast besitzen. Eisenoxid Nanopartikel (Eisenoxid in Form von Magnetit) gehören auf Grund ihres starken Einfluss auf die T_2^* Relaxation zu den am meisten verwendeten Partikeln^[252-254]. Ziel dieses Projekts ist es, geeignete Nachweismethoden für einen quantitativen Nachweis von mit eisenhaltigen Nanopartikeln markierten Zellen zu etablieren.

9.5.1 MRT-Messungen

MRT-Messungen für die Detektion markierter Zellen bieten im Gegensatz zu den ebenfalls in der Medizin vorhandenen bildgebenden Methoden wie Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) den Vorteil, dass der Patient keiner ionisierenden Strahlung ausgesetzt ist. Des Weiteren bieten MRT Messungen transplantierten Zellen zusätzliche anatomische und pathologische Informationen über das umgebende Gewebe wie z.B. Ödeme oder Entzündungen rund um die Transplantationsstelle^[255, 256]. Diese Informationen helfen Ärzten und Forschern, ein tieferes Wissen über die jeweilige Zelltherapie zu erlangen.

Für erste *in vitro* Messungen am MRT ist es notwendig, die Detektionsgrenze des MRT Geräts zu ermitteln, um so zu klären, welche Zellmengen nach einer Transplantation *in vivo* visualisierbar sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Eisengehalt von sowohl HeLa-Zellen als auch MSCs, die mit Feridex® markiert wurden, zwischen 10-25 pg Eisen/Zelle liegt^[257, 258]. Im Folgenden wird von einer hypothetischen Eisenbeladung von 10 pg/Zelle ausgegangen, um die einer bestimmten Eisenmenge äquivalente Zellmenge

zu berechnen. Für die MRT-Messungen als auch spätere Zellversuche wird das Kontrastmittel Resovist® verwendet. Resovist® sind mit einer Dextranhülle versehener SPIO-Partikelaggregate, die im Größenbereich von 50 - 180 nm liegen und eine negative Ladung von -70 mV aufweisen. Dextran-modifizierte Eisenoxidpartikel sind für Tier- und klinische Studien von Vorteil, da die Partikel biokompatibel und bioabbaubar sind. Sie werden über die für den Eisenstoffwechsel im Körper verwendeten Stoffwechselwege abgebaut, beginnend durch die Aufnahme in Kupffersche Zellen oder Makrophagen ^[259]. Mit Hilfe der oben genannten Näherung der Zellbeladung kann aus einer im MRT gemessenen Verdünnungsreihe an eisenhaltigen Partikeln die kleinste noch zu detektierende Zellzahl ermittelt werden. Hierzu wurde eine Konzentrationsreihe aus Resovist® in 0,5 und 2 %-Agarose in einer speziellen Kleintierspule an einem 3T MRT vermessen. In Abbildung 38 zeigt sich, dass eine Eisenkonzentration von 2,77 µg/mL noch mit bloßem Auge in ihrem MRT T₁ Signal von einer Konzentration von 0,92 µg/mL unterscheiden lässt.

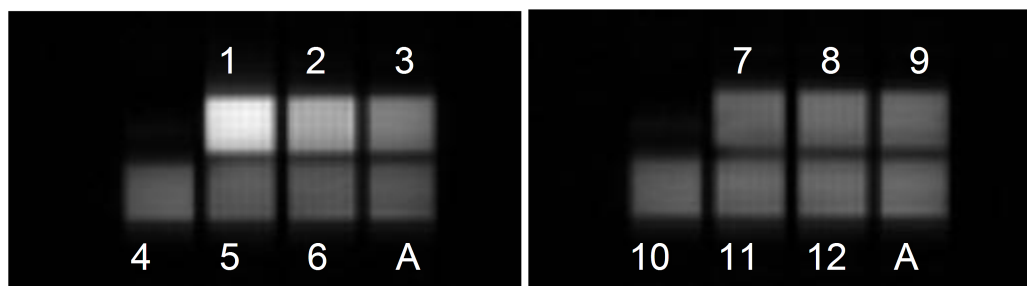


Abbildung 38: Darstellung des MRT T₁ Signals einer Resovist® Verdünnungsreihe in 0,5 % Agarose als Graustufenbild. Die Nummern entsprechen den in Tabelle 6 angegebenen Eisenkonzentrationen; A= Agarose.

Tabelle 6: Probenbezeichnung der MRT Messungen aus Abbildung 38.

Probennummer	Fe [µg/mL]	Detektierbare Zellzahl (bei einer Beladung von 10pg Fe/Zelle)
1	25	
2	8,33333333	~ 1.000.000/mL
3	2,77777778	
4	0,92592593	~ 100.000/mL
5	0,30864198	
6	0,10288066	~ 10.000/mL
7	0,03429355	
8	0,01143118	~ 1000/mL
9	0,00381039	
10	0,00127013	~ 100/mL
11	0,00042338	
12	0,00014113	

Die Analyse der Relaxationsraten $1/T_1$ (Abbildung 39) zeigt, dass unterhalb einer Eisenkonzentration von $0,92 \mu\text{g/mL}$ keine Signalunterscheidung mehr möglich ist. Die Konzentration der als Matrix verwendeten Agarose hat hierbei keinen Einfluss auf die Detektionsgrenze. Auch eine Gewichtung der Messung nach T_2 und T_2^* ergab keine geringere Detektionsgrenze. Somit liegt die Detektionsgrenze des hier verwendeten MRT Messaufbaus, bestehend aus einem klinischen 3T MRT und einer eigens angefertigten Kleintierspule, bei knapp unter $1 \mu\text{g/mL}$ Eisen. Dies würde bei einer Zellbeladung von $10 \text{ pg Eisen/ Zelle}$ ungefähr $100.000 \text{ Zellen/mL}$ entsprechen.

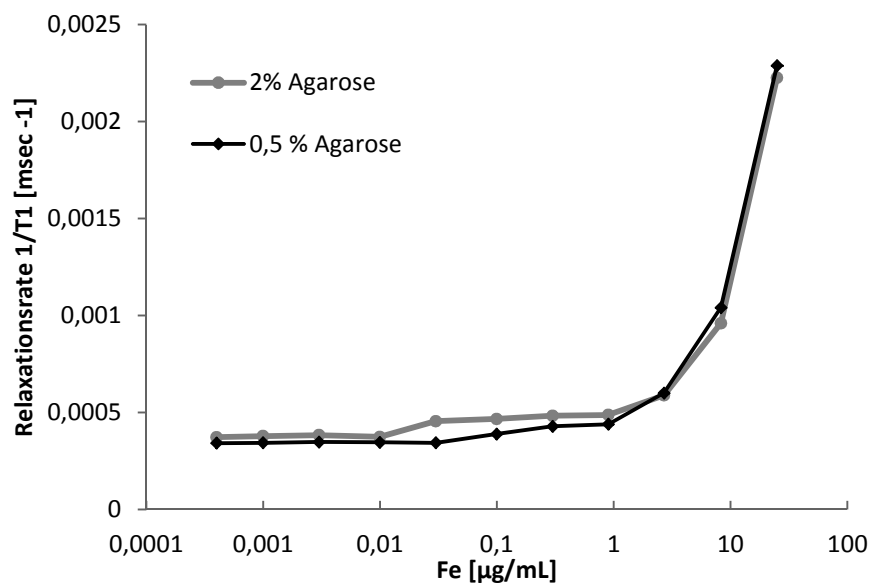


Abbildung 39: Relaxationsrate $1/T_1$ einer Resovist® Verdünnungsreihe in unterschiedlich konzentrierter Agarose. $1/T_1$ Werte wurden mit Hilfe einer 3T MRT Messung ermittelt.

Die Verwendung bestimmter mathematischer Bildnachbearbeitungsmethoden (Hanning Filter und Phasenmaske) eröffnet die Möglichkeit einer deutlichen Kontrastverstärkung im MRT-Bild und folglich eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze. Diese Methode könnte auch bei den hier dargestellten Messungen zu einer noch deutlich herabgesetzten Detektionsgrenze führen. Im klinischen Bereich ist die Nachweisgrenze bedingt durch Atem- und Herzbewegungen jedoch deutlich höher und liegt bei 10^4 - 10^5 Zellen^[260]. Generell gilt zu beachten, dass die Quantifizierung von SPIO-markierten Zellen mittels MRT eine indirekte Methode darstellt. Die beobachtete Signaländerung ist das Resultat der gesamten Konzentration an Nanopartikeln und nicht die der absoluten Zellzahl^[261]. Als wichtige Faktoren, die das Detektionslimit am MRT beeinflussen, gelten auch die Zahl der SPIOs pro Zelle und die Zellzahl pro Voxel^[262, 263].

9.5.2 Quantitative Eisenmessungen

Die Messung von mit eisenhaltigen NP markierten Zellen im MRT erfordert begleitende Methoden, mit Hilfe derer die exakte Eisenbeladung und Konzentration einer Probe vor der MRT Messung bestimmt werden kann. Für diese quantitativen Eisenmessungen bieten sich unterschiedliche Methoden an, die im Folgenden beschrieben werden.

Bei ^1H NMR (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanzspektroskopie) Messungen macht man sich den proportionalen Zusammenhang von Eisengehalt und gemessener Relaxationsrate $1/T_1$ zu Nutze, um die absolute Eisenmenge in einer Probe zu bestimmen. Diese Messung benötigt freie Eisen Ionen. Deshalb ist es notwendig, die zu analysierende Probe vor der Messung mit einem Säuregemisch (2/3 70 % Perchlorsäure, 1/3 65 % Salpetersäure) zu behandeln. Eine quantitative Eisenbestimmung ist auch mit Hilfe der UV/VIS Spektroskopie möglich ^[264]. Die zu messenden Proben werden hierbei wie auch bei der ^1H NMR-Messung zunächst über Nacht bei 110°C getrocknet und dann für 4 h mit 5 M HCl bei 60°C verdaut. Hierbei bildet sich ein Komplex, der nicht näher beschrieben ist, jedoch bei einer UV/VIS Messung bei 351 nm eine signifikante Absorption liefert, die in einem linearen Verhältnis zum Eisengehalt steht.

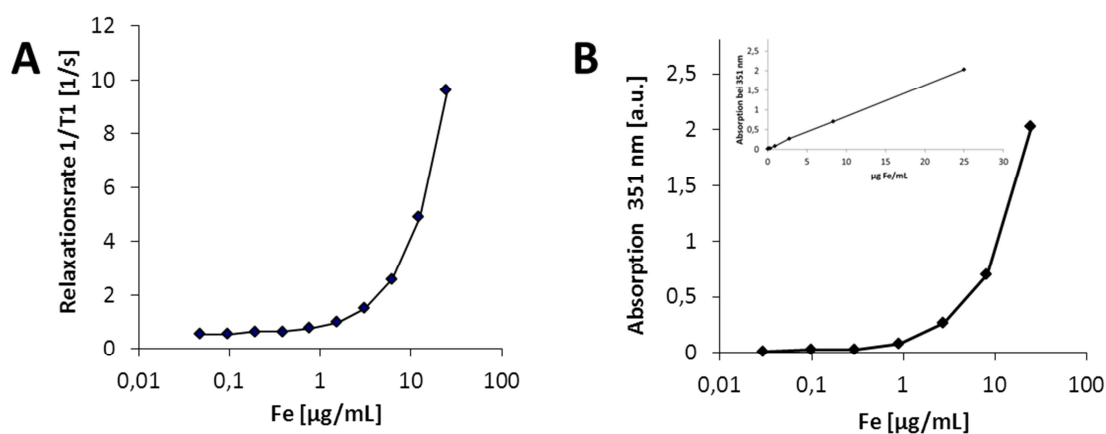


Abbildung 40: Eichgeraden für eine quantitative Eisenmessung. A: ^1H NMR; B: UV/ VIS Spektroskopie, Inlett zeigt das lineare Verhältnis des UV/VIS Signals bei 351 nm und der Eisenmenge mit $R^2 = 0,9996$.

Die Detektionsgrenze sowohl der ^1H NMR als auch der UV/VIS Messungen liegt bei $\sim 1 \mu\text{g}$ Eisen/mL (Abbildung 40). Dies entspricht der Detektionsgrenze der MRT Messungen. Somit können auch mit diesen quantitativen Messmethoden nur Zellen bis zu einer minimalen Dichte von $100.000/\text{mL}$ nachgewiesen werden, wenn man von einer Beladung von 10 pg Eisen/Zelle ausgeht. Gerade im Hinblick auf Zellversuche ist jedoch

ein geringes Detektionslimit der Quantifizierungsmethoden wünschenswert, um so Material (=Zelleinsatz) einsparen zu können.

Eine Eisen-Quantifizierung mittels ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy*) Messungen sollte hierfür besser geeignet sein. Diese Eisennachweismethode ist sehr sensitiv und erlaubt Messungen bis zu einem Eisengehalt von 0,1 µg/mL (Meßdaten Kilian Schuller). Dies würde einer Detektionsgrenze von 10.000 Zellen/mL entsprechen, bei der hypothetischen Zellbeladung von 10 pg Eisen/Zelle. Für Messungen von Eisen in Zellen ist hierbei noch zu klären, ob das Hintergrundrauschen durch die unbeladenen Zellen sich störend auf das Messsignal auswirkt und somit das Detektionslimit heraufgesetzt wird. Hiermit wäre es möglich das Detektionslimit für eisenmarkierte Zellen um den Faktor 10 im Vergleich zu MRT, ¹H NMR und UV/VIS Messungen zu verringern.

9.5.3 Zellmarkierungen mit eisenhaltigen Nanopartikeln

Die in Kapitel 9.5.1 und 9.5.2 beschriebenen etablierten Nachweismethoden für die Detektion von eisenmarkierten Zellen wurden im Folgenden mit der Messung markierter Zellen verifiziert. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen eines literaturbekannten Transfektionsagens (poly-L-Lysin, PLL) getestet, um die Beladungsdichte der Zellen zu erhöhen. Aus der Literatur ist auch bekannt, dass die Packungsdichte der SPIOs innerhalb der Zelle eine Auswirkung auf das MRT-Signal hat ^[265]. Hierzu wurden Untersuchungen mit synthetisierten Kapseln, die aus SPIOs bestehen, durchgeführt.

Für eine vergleichende Analyse von ¹H NMR und MRT wurden HeLa-Zellen in 6-well Platten kultiviert und mit Resovist® (1x entspricht 25 µg Eisen/mL) sowie unterschiedlichen Mengen des Transfektionsagens PLL (1x entspricht 1,5 µg/mL) für 24 h inkubiert. Diese Zellen wurden für die NMR- und MR-Messungen abgelöst und in der entsprechenden Zellzahl für die jeweilige Messmethode eingesetzt (MRT 200.000 Zellen/mL, NMR 400.000/mL).

Anhand der ^1H NMR Messungen (Abbildung 41, Tabelle 7) konnte ein mit steigender PLL oder Resovist[®] Konzentration erhöhter Eisengehalt festgestellt werden.

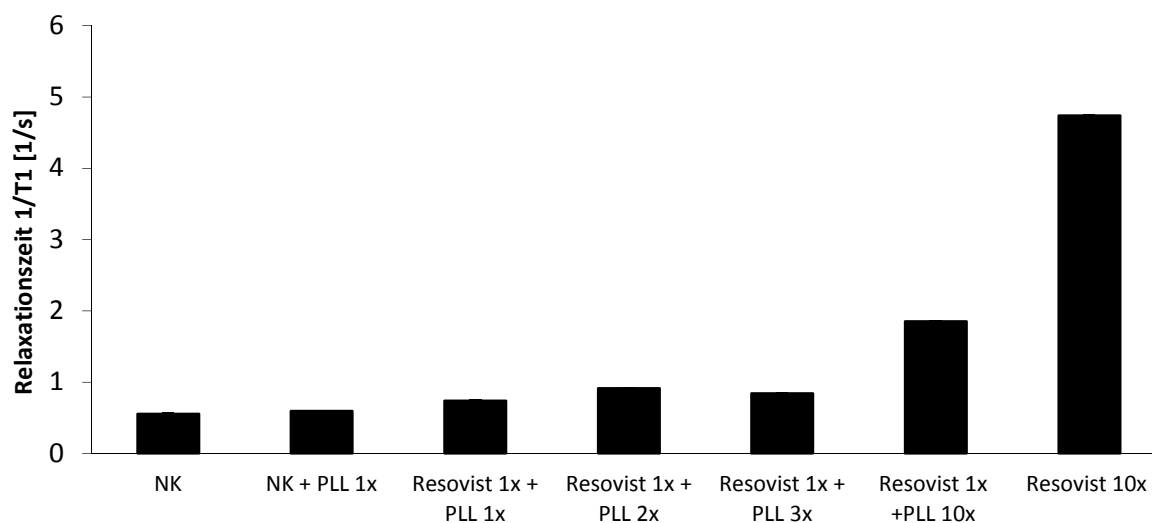


Abbildung 41: ^1H NMR Messung unterschiedlicher HeLa-Zellproben (400.000/mL). Die Zellen wurden vor der NMR Messung für 24 h mit den entsprechenden Partikelkonzentrationen inkubiert. 1x Resovist[®]=25 μg Eisen/mL; 1x PLL=1,5 μg /mL Poly-L-Lysin; Kapseln (UP) 75 μg /mL. NK: Negativkontrolle (nur Zellen).

Die Proben Resovist[®] 1x + PLL 10x sowie Resovist[®] 10x zeigten einen signifikant erhöhten Eisengehalt pro Zelle. Mit dem Hilfe dieser Resovist[®] und PLL Konzentrationen konnte eine Eisenbeladung von $\sim 10\text{-}30$ pg Eisen pro Zelle erreicht werden.

Tabelle 7: Eisengehalt von HeLa Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Resovist[®] und PLL Konzentrationen basierend auf ^1H NMR Messungen.

Probe	Fe [mL/mL] basierend auf NMR Eichgerade	Fe pro Zelle [pg]
NK	0,24	0,60
NK + PLL 1x	0,35	0,89
Resovist [®] 1x + PLL 1x	0,75	1,89
Resovist [®] 1x + PLL 2x	1,23	3,09
Resovist [®] 1x + PLL 3x	1,04	2,60
Resovist [®] 1x + PLL 10x	3,83	9,59
Resovist 10 x	11,83	29,58

Im T_2 gewichteten MRT Bild (Abbildung 42 und Abbildung 43) zeigt sich, dass nur die Zellproben mit Resovist[®] 1x+10x PLL sowie Resovist[®] 10x ein erkennbares Signal erzeugen. Dies deckt sich mit den durch die NMR Messungen ermittelten Eisengehalten der Zellen, die nur bei diesen beiden Konditionen deutlich erhöht waren. Somit konnte

die aus der Literatur bekannte Eisenbeladung pro Zelle nur mit Hilfe hoher Partikel- oder Transfektionsagenzkonzentrationen erreicht werden.

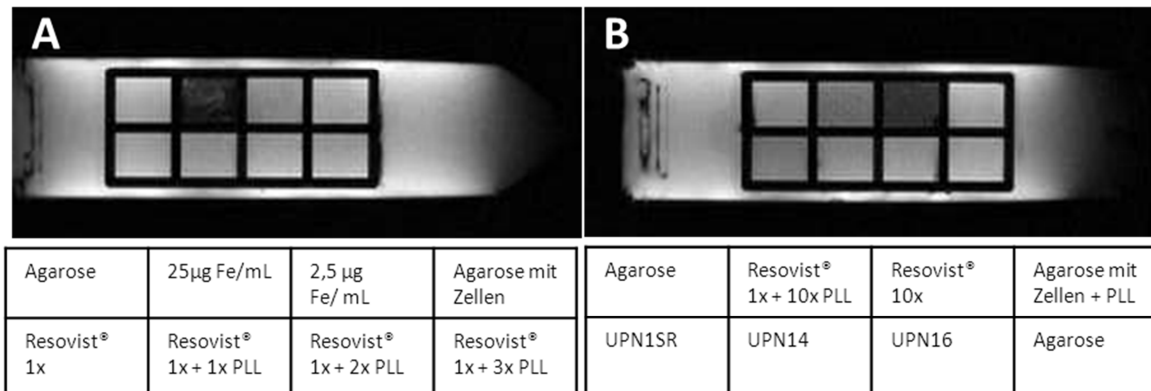


Abbildung 42: T2 gewichtete MRT Messungen von HeLa-Zellen (200.000/mL). Die Zellen wurden vor der Einbettung für die MRT Messung für 24 h mit den entsprechenden Partikelkonzentrationen inkubiert. 1x Resovist®=25 µg Eisen/mL; 1x PLL= 1,5 µg/mL Poly-L-Lysin; Kapseln (UP) 75 µg/mL.

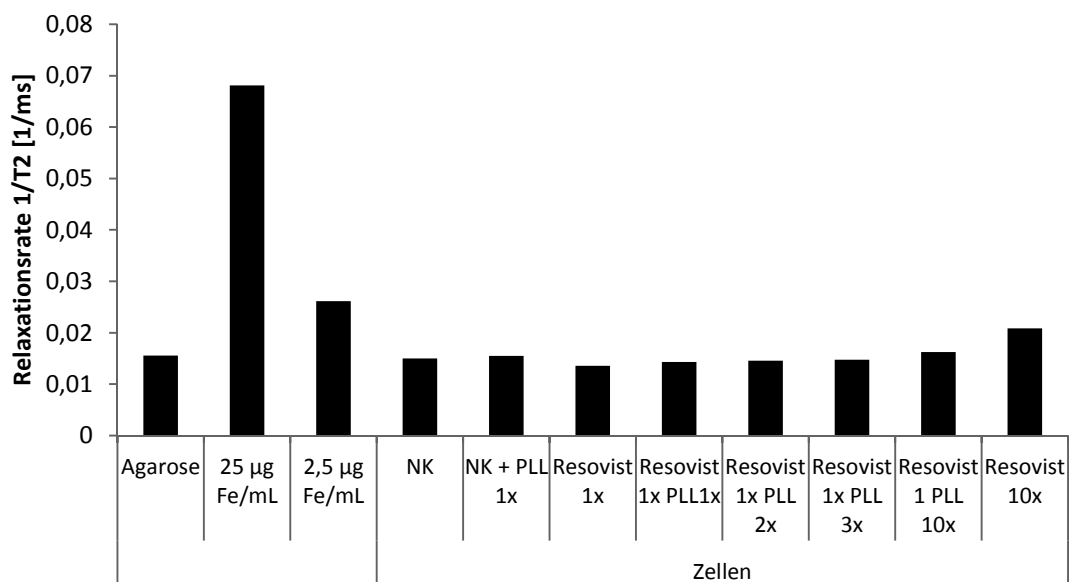


Abbildung 43: Relaxationsraten 1/T2 unterschiedlicher HeLa-Zellproben(200.000/mL). T2 Werte wurden aus dem in Abbildung 42 zu sehenden MRT Bild ermittelt. Die Zellen wurden vor der Einbettung für die MRT Messung für 24 h mit den entsprechenden Partikelkonzentrationen inkubiert. 1x Resovist®=25µg Eisen/mL; 1x PLL= 1,5 µg/mL Poly-L-Lysin; Kapseln (UP) 75 µg/mL. NK: Negativkontrolle (nur Zellen).

Kommerziell erhältliche MRT Kontrastmittel wie Resovist® oder Supravist® bestehen aus SPIOs (*super paramagnetic iron oxide particles*) oder USPIOs (*ultrasmall super paramagnetic iron oxide particles*). Diese Eisenoxid-Partikel können mittels inverser Miniemulsionstechnik verkapselt werden. Werden diese so beladenen Kapseln von

Zellen aufgenommen, ist die Packungsdichte der Eisenoxid-Partikel innerhalb der Zelle deutlich höher. Dies könnte zu einer verbesserten Kontrastdarstellung im MRT führen [265]. Um dies zu testen, wurden verschiedene Kapseln (synthetisiert von Umaporn Paipansiri), die unterschiedliche Mengen an Eisen (Supravist®) enthalten, in ihrem Zellaufnahmeverhalten und ihrer Darstellbarkeit im MRT untersucht. Diese Kapseln bestehen aus einer Schale vernetzter Supravist® Partikel. Diese besitzen eine Dextranhülle, die mit Toluol-2,4-diisocyanat (TDI) vernetzt wurde. In Tabelle 8 sind die Eigenschaften der verwendeten Kapseln aufgelistet, Abbildung 44 zeigt TEM Aufnahmen der entsprechenden Kapseln.

Tabelle 8: Charakterisierung der von Umaporn Paipansiri synthetisierten Kapseln mit unterschiedlichem Eisengehalt. Die Größenverteilung ist bimodal.

Bezeichnung	Monomer [g]	Partikel-inhalt	Tensid	Ø [nm]	Tensid für die Aufnahme in wässriger Phase	Eisengehalt [µg/g]
UPN1SR	TDI 0,14	Sulforhodamin 101	KLE	129/368	SDS	41,21
UPN14	TDI 0,35	Sulforhodamin 101	KLE	236/814	SDS	21,8
UPN15	TDI 0,7	Sulforhodamin 101	KLE	129/816	SDS	9,48
UPN16	TDI 1,05	Sulforhodamin 101	KLE	127/297	SDS	5,72

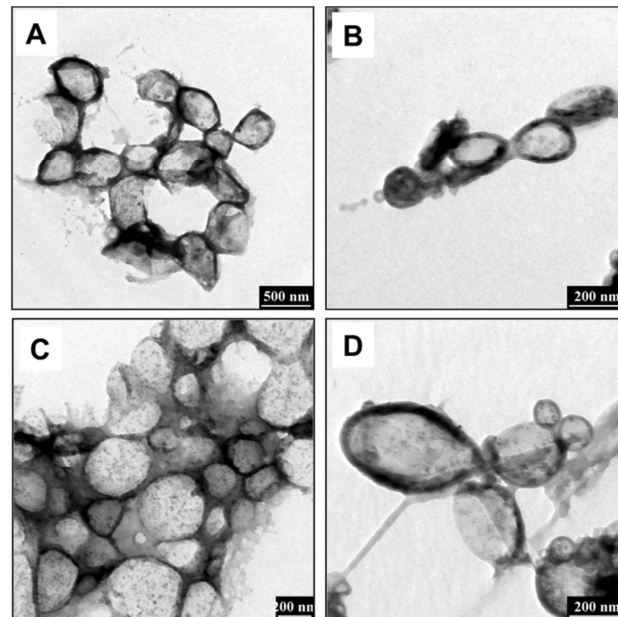


Abbildung 44: TEM Aufnahmen unterschiedlicher Supravist®-haltiger Kapseln. A: UPN15, B; UPN14, C; UPN15, UPN16.

Die Aufnahme der Supravist®-haltigen Kapseln stellt sich sowohl in den durchflusszytometrischen Messungen (Abbildung 45 A) als auch in der Berliner Blaufärbung (Abbildung 46) als sehr gering bis nicht detektierbar dar. Gleichzeitig zeigen alle Kapseln keine Toxizität (Abbildung 45 B). Lediglich die Kapsel UPN16, die den geringsten Eisengehalt und den höchsten Crosslinkergehalt aufweist, zeigt eine geringe Aufnahme in hMSCs. Auch die Verwendung des Transfektionsagens PLL führt nicht zu einer Erhöhung der Kapselaufnahme.

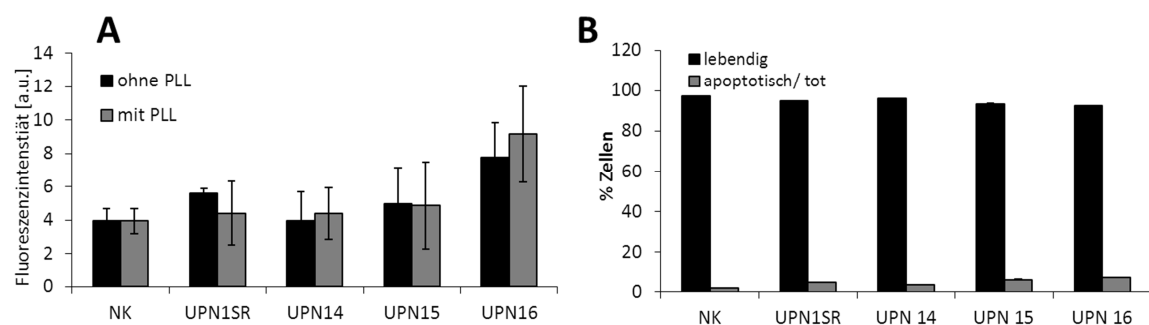


Abbildung 45: Aufnahme (A) und Toxizität (B) unterschiedlicher Supravist®-haltiger Kapseln in hMSCs nach 24 h Inkubation mit 75 µg/mL Kapseln.

Die Aufnahme der Kapseln ist so gering, dass auch mittels der Berliner Blaufärbung (Abbildung 46) keine sichtbaren Eisenagglomerate in den Zellen erkennbar sind. Die Nachweisgrenze der Berliner Blaufärbung liegt bei ~2pg Fe/ Zelle. Somit sind die Zellen

noch geringer bist gar nicht mit Eisen beladen, was diese Kapseln ungeeignet für die Markierung von Zellen für den Nachweis im MRT macht. Dies zeigt sich auch im MRT Bild (Abbildung 42 B), hier konnten die mit den Supravist®-haltigen Kapseln inkubierten Zellen keinen Kontrast erzeugen.

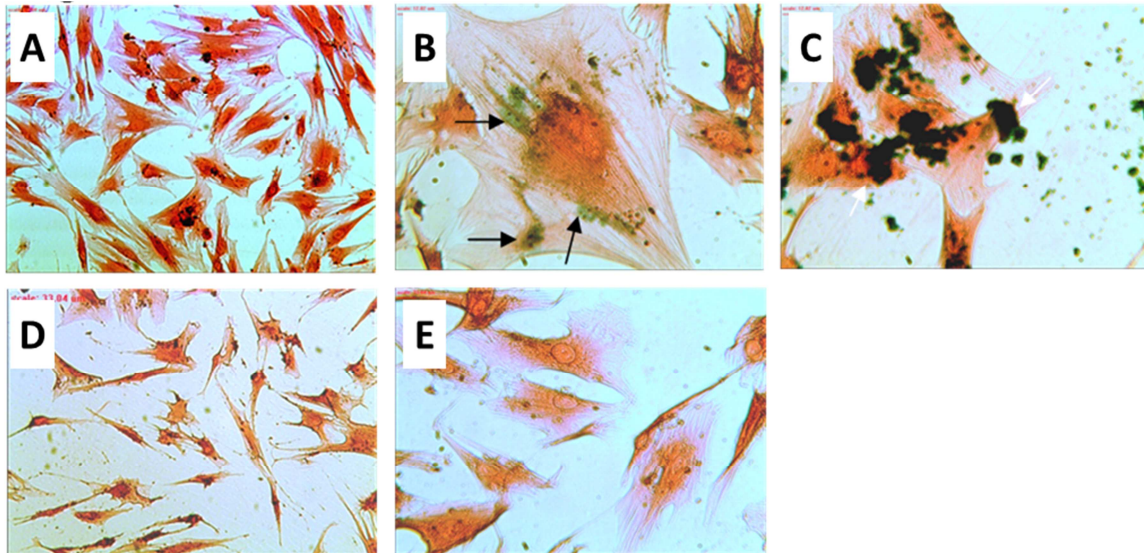


Abbildung 46: Nachweis aufgenommener eisenhaltiger Nanopartikel und Kapseln in hMSCs mittels Berliner Blaufärbung. Eisenhaltige Partikel werden dunkel bis schwarze dargestellt. A: Negativkontrolle; B: Resovist® 1x PLL 1x; C: Resovist® 10x; D: UPN1SR 1x PLL, E: UPN15 1xPLL. Pfeile markieren sichtbare Eisenagglomerate.

In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Zellmarkierung mit SPIOS vorhanden. Hierbei stellt die einfachste Methode die Zugabe von kationischen Transfektionsagenzien dar. Hierbei werden die negativ geladenen SPIOS mit den positiven geladenen Transfektionsagenzien umhüllt und sind so besser in der Lage mit negativ geladenen Zellmembran zu interagieren. Dadurch wird die Partikelaufnahme gesteigert ^[258]. Diese Methode muss jedoch für einzelne Partikel und Zelllinien jeweils empirisch optimiert werden. Im Fall der oben beschriebenen Kapseln konnte auch mit Hilfe von PLL keine erhöhte Partikelaufnahme bewirkt werden.

Die Markierung von Zellen und insbesondere von Stammzellen für eine Detektion im MRT ist eine vielversprechende Methode, um die Wirkung zellulärer Therapien besser verstehen und verbessern zu können. Die *in vitro* Analyse der markierten Zellen ist hierbei ein wichtiger Bestandteil. Im vorliegenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine quantitative Bestimmung des zellulären Eisengehalts nach Inkubation mit SPIOS sowohl mit Hilfe von H^1 NMR als auch UV/ VIS Messungen bis zu einem Detektionslimit

von 100.000 Zellen /mL (bei einer Beladung von 10 pg Fe/Zelle) erfolgen kann. Somit sind diese beiden Nachweismethoden nicht sensitiver als die MRT Messung an einem 3T MRT Gerät mit Kleintierspule. Eine Markierung von Zellen mit Kapseln, die aus vernetzten Supravist® Partikeln bestehen, zeigte nur eine sehr geringe Beladung der Zellen. Für weitere Arbeiten mit eisenmarkierten Zellen ist es notwendig, die Beladung der Zellen möglichst hochkonzentriert zu bekommen, dies würde auch eine deutlich geringere Zellzahl für die Quantifizierungsmethoden erfordern und so das Detektionslimit der MRT Messung deutlich herabsetzen.

10 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde systematisch die Interaktion von unterschiedlichen polymeren Nanopartikeln auf die Zellfunktionalität und das Differenzierungspotential zweier humaner Stammzelllinien (mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen) untersucht. Als Modellsystem wurden Polystyrol-Partikel für bioinerte Nanopartikel und PLLA-Partikel als Modell für bioabbaubare Nanopartikel gewählt.

Die Analyse der Partikelaufnahme und der Zytotoxizität ergab, dass alle getesteten Partikel nach einem Zeitraum von 24 h und einer Inkubation mit 300 µg/mL Partikeln in beiden Zellsorten nicht toxisch waren. Für die CTMA-Cl-stabilisierten Partikel wurde während Differenzierungsversuche mit hMSCs eine Langzeittoxizität festgestellt, so dass diese Partikel für weitere Versuche nicht verwendet werden konnten.

Alle Partikel wurden in die Zellen aufgenommen. Die Lutensol-stabilisierten Polystyrol-Partikel zeigten sowohl in unfunktionalisierter Form als auch mit Aminogruppen auf der Oberfläche ein geringeres Aufnahmeverhalten in hMSCs und wurden deswegen nicht für weitere Versuche verwendet. Die SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel zeigten eine gute Aufnahme, die durch die Funktionalisierung mit Carboxylgruppen um ca. das 3-fache verstärkt werden konnte (hMSCs). Gleiches wurde für die CTMA-Cl stabilisierten Polystyrol und dem dazugehörigen aminofunktionalisierten Partikel beobachtet (hMSCs). In hHSCs wurden nur die SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel (nicht funktionalisiert, carboxylfunktionalisiert) getestet. Hierbei konnte kein Unterschied bezüglich der Aufnahme festgestellt werden. Die PLLA- und PLLA-Fe-Partikel wurden sowohl in hMSCs als auch in hHSCs sehr gut und besser als die Polystyrol-Partikel aufgenommen. Das in den Partikeln eingebaute Magnetit zeigt keine Auswirkungen auf die Zellaufnahme. Für weitere Versuche wurden deshalb auf Grund der Aufnahme und Toxizitätsdaten die SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel (PS und PS-COOH) sowie die ebenfalls SDS-stabilisierten PLLA-Partikel (PLLA und PLLA-Fe) gewählt. Somit standen 4 Partikel zur Auswahl, die sich sowohl in ihrer Größe als auch im verwendeten Tensid

nicht unterscheiden und so Aussagen über den Einfluss von Oberflächenfunktionalisierung sowie Magnetit zulassen.

Die Zellfunktionalität der hMSCs unter Partikeleinfluss wurde mit Hilfe von IL-6 und IL-8 Messungen untersucht, hierbei zeigte sich, dass nur der PLLA-Fe-Partikel zu einer signifikant erhöhten IL-8 Ausschüttung führte, die Sekretion von IL-6 blieb vollständig unverändert. Die IL-8 Sekretion der hHSCs wurde durch die Anwesenheit der Partikel nicht verändert.

Um den Einfluss der oben beschriebenen Partikel auf das Differenzierungspotential von hMSCs und hHSCs zu untersuchen, wurden beide Zelllinien vor der Induktion der Differenzierung für 24 h mit 300 µg/mL Partikeln inkubiert. Sowohl die histochemischen Färbungen der differenzierten hMSCs als auch die CD-Marker-Färbungen der differenzierten hHSCs zeigten keinen Einfluss der Partikel auf die Differenzierungsfähigkeit. Bei den hMSCs konnte auch keine durch die Partikel hervorgerufene Differenzierung nachgewiesen werden. Die Analyse der Differenzierung auf RNA-Ebene (qPCR) ergab jedoch für beide Zelllinien, dass einzelne Partikel einzelne Differenzierungsmarker in ihrer Expression positiv oder negativ beeinflussen. Einzig der PLLA-Partikel zeigt bei allen untersuchten Differenzierungsrichtungen in beiden Zelllinien keine Veränderung der Expression. Die jeweils beobachteten Expressionsveränderungen sind jedoch nicht stark genug, um die Differenzierung sichtbar zu beeinflussen, was die histologischen bzw. CD-Marker-Färbungen gezeigt haben.

In einem Kooperationsprojekt mit der Gruppe von Arancha del Campo (MPI für Polymerforschung) wurde der Einfluss unterschiedlicher BMP-2-Peptide auf die osteogene Differenzierung von hMSCs untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Peptide in keiner Konzentration und Kombination eine positive Wirkung auf die osteogene Differenzierung haben.

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit Kerstin Münnemann (MPI für Polymerforschung) konnte gezeigt werden, dass eine quantitative Bestimmung des zellulären Eisengehalts nach Inkubation mit SPIOs sowohl mit Hilfe von MRT, H^1 NMR als auch UV/VIS Messungen bis zu einem Detektionslimit von 100.000 Zellen /mL (bei einer Beladung von 10 pg Fe/Zelle) erfolgen kann.

11 Summary and outlook

This thesis investigates with the influence of different polymeric nanoparticles on the cell functionality and differentiation capacity of human mesenchymal and hematopoietic stem cells. As a model system two bioinert polystyrene and two biodegradable PLLA particles were chosen.

Flow cytometry analysis showed that all particles are non-toxic after an incubation time of 24 h with a particle amount of 300 µg/mL either for hMSCs or hHSCs. In the case of the CTMA-Cl stabilized polystyrene particles a long term toxicity during hMSC differentiation was detected. These particles were not used for further experiments.

All particles showed cellular uptake, but the uptake of the Lutensol stabilized polystyrene particles (non-functionalized, amino-functionalized) in hMSCs was low. So these particles were not used for other experiments. For hMSCs the SDS stabilized polystyrene particles showed a good uptake rate in hMSCs, which was 3 fold increased in the case of the carboxy-functionalized particles. The CTMA-Cl stabilized polystyrene particles (non-functionalized, amino-functionalized) displayed the same uptake behavior in hMSCs. In hHSCs only the SDS stabilized polystyrene particles were tested, here the functionalization with carboxy groups did not lead to an increased cell uptake.

The cellular uptake of the PLLA and PLLA-Fe particles in hMSCs and hHSCs achieved good results that were better than those of the polystyrene particles. The incorporated magnetite did not influence the cellular uptake.

Two sets of tested particles were chosen for further experiments: the SDS stabilized polystyrene particles (PS and PS-COOH) and the also SDS stabilized PLLA and PLLA-Fe particles. These 4 particles were similar in size and stabilized with the same surfactant therefore allowing conclusions about the influence of surface functionality and magnetite on stem cells.

Cell functionality was analyzed with quantitative IL-6 and IL-8 measurements. For hMSCS only the PLLA-Fe particle leads to a significant higher IL-8 secretion, IL-6 secretions was

not affected. The IL-8 secretion of hHSCs was not altered in the presence of all tested particles.

To test whether the above described particles show an influence on the differentiation potential of hMSCs and hHSCs, both cell lines were incubated for 24 h with 300 µg/mL particles before inducing differentiation. Cytochemical staining (hMSCs) and CD marker staining did not show changes in the differentiation due to particle presence. Particles did also show no potential to induce differentiation in hMSCs. Analysis of the differentiation on the RNA level with qPCR displayed for both cell lines, that some particles had a positive or negative influence on the expression of particular differentiation markers. The only particle which did not alter the expression profile in both cell lines was the PLLA particle. The observed changes in the differentiation marker expression were however not severe enough to cause a visible effect in the differentiation process; this was shown by positive cytochemical staining (hMSCs) and CD marker stainings (hHSCs).

The influence of different BMP-2 peptides on the osteogenic differentiation of hMSCs was analyzed in a cooperation project with the group of Arancha del Campo (MPI for Polymer Research). The results showed that there was no positive effects of the different peptides on the osteogenic differentiation. This was the case for all the tested concentrations and peptide combinations.

In cooperation with Kerstin Münnemann (MPI for Polymer Research) it could be shown, that quantitative analysis of the iron content of with SPIOs incubated cells is possible down to 100 .000 cells/mL (with an iron payload of 10 pg/cell). This was the case for MRI, H¹ NMR and UV/VIS measurements.

12 Literatur

1. Chaudhry, Q., et al., *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector*. Food Additives and Contaminants, 2008. **25**(3): p. 241-258.
2. Ito, Y., *Regulation of cell functions by micropattern-immobilized biosignal molecules*. Nanotechnology, 1998. **9**(3): p. 200-204.
3. Davis, M.E., et al., *Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1067-U140.
4. McCarthy, T.D., et al., *Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention*. Molecular Pharmaceutics, 2005. **2**(4): p. 312-318.
5. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(12): p. 751-760.
6. Dai, H.J., et al., *Multiplexed multicolor Raman imaging of live cells with isotopically modified single walled carbon nanotubes*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(41): p. 13540-+.
7. Parak, W.J., et al., *Biological applications of gold nanoparticles*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(9): p. 1896-1908.
8. Resch-Genger, U., et al., *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nature Methods, 2008. **5**(9): p. 763-775.
9. Santos, G.W., *Historical background to hematopoietic stem cell transplantation*. Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation., ed. K. Atkinson. 2000, Cambridge, UKCambridge University Press;.10. Horowitz, M., *Uses and growth of hematopoietic cell transplantation*, in *Hematopoietic cell transplantation.*, S.J. Forman, Editor. 1999, MA: Blackwell Science Inc. p. 12-18.
11. Hall, P.A. and F.M. Watt, *Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity*. Development, 1989. **106**(4): p. 619-33.
12. Eckfeldt, C.E., E.M. Mendenhall, and C.M. Verfaillie, *The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(9): p. 726-37.
13. Friedenstein, A.J., *Precursor cells of mechanocytes*. Int Rev Cytol, 1976. **47**: p. 327-59.
14. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
15. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
16. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
17. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
18. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
19. Parekkadan, B. and J.M. Milwid, *Mesenchymal stem cells as therapeutics*. Annu Rev Biomed Eng, 2010. **12**: p. 87-117.
20. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.

21. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(3): p. 301-16.
22. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
23. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 726-36.
24. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 259-64.
25. Menicanin, D., et al., *Genomic profiling of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Rev, 2009. **5**(1): p. 36-50.
26. Kim, D.H., et al., *Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell*. Cytokine, 2005. **31**(2): p. 119-26.
27. Tsai, M.S., et al., *Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2511-23.
28. Dani, C., *Embryonic stem cell-derived adipogenesis*. Cells Tissues Organs, 1999. **165**(3-4): p. 173-80.
29. Shugart, E.C. and R.M. Umek, *Dexamethasone signaling is required to establish the postmitotic state of adipocyte development*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(10): p. 1091-8.
30. Obregon, M.J., *Thyroid hormone and adipocyte differentiation*. Thyroid, 2008. **18**(2): p. 185-95.
31. Prawitt, J., et al., *Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells*. Experimental Cell Research, 2008. **314**(4): p. 814-24.
32. Deree, J., et al., *Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition*. Clinics (Sao Paulo), 2008. **63**(3): p. 321-8.
33. Yang, D.C., et al., *cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1540.
34. Feve, B., *Adipogenesis: cellular and molecular aspects*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 483-99.
35. Smas, C.M., et al., *Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31751-8.
36. Morrison, R.F. and S.R. Farmer, *Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3116S-3121S.
37. Rosen, E.D., *The transcriptional basis of adipocyte development*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 31-4.
38. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
39. Rangwala, S.M. and M.A. Lazar, *Transcriptional control of adipogenesis*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 535-59.

40. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
41. Holst, D. and P.A. Grimaldi, *New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(3): p. 241-5.
42. Schwarz, E.J., et al., *Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1552-61.
43. Elberg, G., J.M. Gimble, and S.Y. Tsai, *Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27815-22.
44. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte - At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-3773.
45. Hunt, C.R., et al., *Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3786-90.
46. Puri, V., et al., *Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34213-8.
47. Melendez-Zajgla, J., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 85.
48. Granchi, D., et al., *Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(3): p. 511-24.
49. Murakami, N., et al., *Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**(2): p. 169-74.
50. Valdes, M.A., et al., *Recombinant bone morphogenetic protein-2 in orthopaedic surgery: a review*. Arch Orthop Trauma Surg, 2009. **129**(12): p. 1651-7.
51. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
52. Westendorf, J.J., R.A. Kahler, and T.M. Schroeder, *Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases*. Gene, 2004. **341**: p. 19-39.
53. Jackson, A., et al., *Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells*. Bone, 2005. **36**(4): p. 585-98.
54. Fujita, K. and S. Janz, *Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 71.
55. Day, T.F., et al., *Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis*. Dev Cell, 2005. **8**(5): p. 739-50.
56. Huang, W., et al., *Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3068-92.
57. Marie, P.J., *Transcription factors controlling osteoblastogenesis*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 98-105.
58. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
59. Ducy, P., et al., *A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development*. Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 1025-36.

60. Kern, B., et al., *Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7101-7.
61. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, 2002. **108**(1): p. 17-29.
62. Lian, J.B., et al., *Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(1-2): p. 1-16.
63. Romero-Prado, M., et al., *Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates*. Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **98**(6): p. 1457-70.
64. Spector, J.A., et al., *Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing*. Plast Reconstr Surg, 2001. **107**(1): p. 124-34.
65. Zhu, J.X., et al., *Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats*. Histochem J, 2001. **33**(1): p. 25-35.
66. Young, M.F., *Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis*. Osteoporos Int, 2003. **14 Suppl 3**: p. S35-42.
67. Long, M.W., *Osteogenesis and bone-marrow-derived cells*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(3): p. 677-90.
68. Herbertson, A. and J.E. Aubin, *Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(2): p. 285-94.
69. Leboy, P.S., et al., *Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures*. J Cell Physiol, 1991. **146**(3): p. 370-8.
70. Bellows, C.G., J.N. Heersche, and J.E. Aubin, *Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone*. Dev Biol, 1990. **140**(1): p. 132-8.
71. Liu, P., et al., *Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) In vitro*. Calcif Tissue Int, 1999. **65**(2): p. 173-80.
72. Chang, Y.L., C.M. Stanford, and J.C. Keller, *Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(2): p. 270-8.
73. Hardingham, T.E., R.A. Oldershaw, and S.R. Tew, *Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis*. J Anat, 2006. **209**(4): p. 469-80.
74. Chang, Y., et al., *Involvement of Gas7 along the ERK1/2 MAP kinase and SOX9 pathway in chondrogenesis of human marrow-derived mesenchymal stem cells*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(11): p. 1403-12.
75. An, C., et al., *IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells*. Ann Biomed Eng, 2010. **38**(4): p. 1647-54.
76. Lefebvre, V., et al., *SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2336-46.

77. Bridgewater, L.C., V. Lefebvre, and B. de Crombrughe, *Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14998-5006.
78. Sekiya, I., et al., *SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10738-44.
79. Zhang, P., S.A. Jimenez, and D.G. Stokes, *Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 117-23.
80. Kou, I. and S. Ikegawa, *SOX9-dependent and -independent transcriptional regulation of human cartilage link protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50942-8.
81. Richter, W., *Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration*. J Intern Med, 2009. **266**(4): p. 390-405.
82. Na, K., et al., *Enhancement of cell proliferation and differentiation by combination of ascorbate and dexamethasone in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes*. Biotechnol Lett, 2007. **29**(10): p. 1453-7.
83. Miyazono, K., *Positive and negative regulation of TGF-beta signaling*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 7): p. 1101-9.
84. Lee, J.W., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications*. Yonsei Med J, 2004. **45 Suppl**: p. 41-7.
85. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. Exp Hematol, 2002. **30**(1): p. 42-8.
86. Krampera, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3722-9.
87. Le Blanc, K., et al., *HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 890-6.
88. Gotherstrom, C., et al., *Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32**(3): p. 265-72.
89. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. Transplantation, 2003. **75**(3): p. 389-97.
90. Stagg, J., et al., *Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2570-7.
91. Krampera, M., et al., *Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 386-98.
92. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 141-50.
93. Djouad, F., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2025-32.

94. Jiang, X.X., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4120-6.
95. Xu, G., et al., *The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **361**(3): p. 745-50.
96. Raffaghello, L., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche*. *Stem Cells*, 2008. **26**(1): p. 151-62.
97. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of severe acute graft-versus-host disease*. *Blood*, 2006. **108**(11): p. 226a-226a.
98. Salem, H.K. and C. Thiernemann, *Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status*. *Stem Cells*, 2010. **28**(3): p. 585-96.
99. Devine, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2999-3001.
100. Gao, X., K.S. Kim, and D. Liu, *Nonviral gene delivery: what we know and what is next*. *AAPS J*, 2007. **9**(1): p. E92-104.
101. Itescu, S., M.D. Schuster, and A.A. Kocher, *New directions in strategies using cell therapy for heart disease*. *J Mol Med (Berl)*, 2003. **81**(5): p. 288-96.
102. Amado, L.C., et al., *Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11474-9.
103. Hodgkinson, C.P., et al., *Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy*. *Hum Gene Ther*, 2010. **21**(11): p. 1513-26.
104. Healey, J.H., et al., *Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients*. *Clin Orthop Relat Res*, 1990(256): p. 280-5.
105. Hibi, H., et al., *Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006. **21**(1): p. 141-7.
106. Jackson, I.T., et al., *Bone marrow grafting in the secondary closure of alveolar-palatal defects in children*. *Br J Plast Surg*, 1981. **34**(4): p. 422-5.
107. Kitoh, H., et al., *Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases*. *Bone*, 2004. **35**(4): p. 892-8.
108. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. *Tissue Engineering*, 2007. **13**(5): p. 947-55.
109. Warnke, P.H., et al., *Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man*. *Lancet*, 2004. **364**(9436): p. 766-70.
110. Guillot, P.V., et al., *Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1717-25.
111. Horwitz, E.M., et al., *Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta*. *Blood*, 2001. **97**(5): p. 1227-31.
112. Spaeth, E., et al., *Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells*. *Gene Ther*, 2008. **15**(10): p. 730-8.
113. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. *Blood*, 1993. **81**(11): p. 2844-53.

114. Civin, C.I., et al., *Positive stem cell selection--basic science*. Prog Clin Biol Res, 1990. **333**: p. 387-401; discussion 402.
115. Ogawa, M., *Changing phenotypes of hematopoietic stem cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(1): p. 3-6.
116. Freund, D., et al., *Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor*. Cell Prolif, 2006. **39**(4): p. 325-32.
117. Harrison, D.E. and R.K. Zhong, *The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10134-8.
118. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
119. Morrison, S.J., et al., *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors*. Development, 1997. **124**(10): p. 1929-39.
120. Dexter, T.M., et al., *Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal*. Blood Cells, 1984. **10**(2-3): p. 315-39.
121. Golde, D.W., *The stem cell*. Sci Am, 1991. **265**(6): p. 86-93.
122. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
123. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
124. Tsiftoglou, A.S., I.S. Vizirianakis, and J. Strouboulis, *Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs*. IUBMB Life, 2009. **61**(8): p. 800-30.
125. Richmond, T.D., M. Chohan, and D.L. Barber, *Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 146-55.
126. Tong, W., J. Zhang, and H.F. Lodish, *Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4604-12.
127. Kim, S.I. and E.H. Bresnick, *Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6777-94.
128. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3368-76.
129. Perry, C. and H. Soreq, *Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements*. Eur J Biochem, 2002. **269**(15): p. 3607-18.
130. Akashi, K., et al., *Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis*. Blood, 2003. **101**(2): p. 383-9.
131. Cross, M.A. and T. Enver, *The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(5): p. 609-13.
132. Ferreira, R., et al., *GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1215-27.
133. Ney, P.A., *Gene expression during terminal erythroid differentiation*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(4): p. 203-8.
134. Bresnick, E.H., et al., *Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains*. J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 1-9.

135. Nerlov, C., *C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 394-400.
136. Lieschke, G.J., *CSF-deficient mice--what have they taught us?* Ciba Found Symp, 1997. **204**: p. 60-74; discussion 74-7.
137. Liu, F., et al., *Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 491-501.
138. Okuda, K., R. Foster, and J.D. Griffin, *Signaling domains of the beta c chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **872**: p. 305-12; discussion 312-3.
139. Blalock, W.L., et al., *Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs*. Leukemia, 1999. **13**(8): p. 1109-66.
140. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. Blood, 1997. **90**(2): p. 489-519.
141. Jackson, C.W., *Megakaryocyte endomitosis: a review*. Int J Cell Cloning, 1990. **8**(4): p. 224-6.
142. Tomer, A., L.A. Harker, and S.A. Burstein, *Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting*. Blood, 1987. **70**(6): p. 1735-42.
143. Tomer, A., L.A. Harker, and S.A. Burstein, *Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes*. Blood, 1988. **71**(5): p. 1244-52.
144. Pendaries, C., S.P. Watson, and J.C. Spalton, *Methods for genetic modification of megakaryocytes and platelets*. Platelets, 2007. **18**(6): p. 393-408.
145. Breton-Gorius, J. and F. Reyes, *Ultrastructure of human bone marrow cell maturation*. Int Rev Cytol, 1976. **46**: p. 251-321.
146. Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven, *Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 1)**: p. 59-70.
147. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. Journal of Cell Biology, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
148. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
149. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Blood, 1995. **86**(2): p. 419-31.
150. Broudy, V.C. and K. Kaushansky, *Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(5): p. 719-25.
151. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: accumulating evidence for an important biological effect on the hematopoietic stem cell*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: p. 39-43.
152. Kaushansky, K. and J.G. Drachman, *The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3359-67.
153. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3339-47.

154. Schulze, H. and R.A. Shivdasani, *Mechanisms of thrombopoiesis*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1717-24.
155. Chang, Y., et al., *From hematopoietic stem cells to platelets*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 318-27.
156. Shivdasani, R.A., *The role of transcription factor NF-E2 in megakaryocyte maturation and platelet production*. Stem Cells, 1996. **14 Suppl 1**: p. 112-5.
157. Shivdasani, R.A., *Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 397-407.
158. Services, D.o.H.a.h., *Regenerative Medicine*. 2006, Department of Health and human Services.
159. Stark, W.J., *Nanoparticles in Biological Systems*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(6): p. 1242-1258.
160. Riehemann, K., et al., *Nanomedicine--challenge and perspectives*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(5): p. 872-97.
161. Ruoslahti, E., et al., *Nanocrystal targeting in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(20): p. 12617-12621.
162. Alivisatos, A.P., W.W. Gu, and C. Larabell, *Quantum dots as cellular probes*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2005. **7**: p. 55-76.
163. Alivisatos, P., *The use of nanocrystals in biological detection*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(1): p. 47-52.
164. Caruso, F., *Nanoengineering of particle surfaces*. Advanced Materials, 2001. **13**(1): p. 11-+.
165. Ying, J.Y., et al., *Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(14): p. 2448-2452.
166. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
167. Sanvicens, N. and M.P. Marco, *Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 425-33.
168. Cattaneo, A.G., et al., *Nanotechnology and human health: risks and benefits*. J Appl Toxicol, 2010. **30**(8): p. 730-44.
169. Klajnert, B. and M. Bryszewska, *BIO-Dendrimer 2008: Symposium on biomedical properties and applications of dendrimers - Lodz, Poland*. Nanomedicine, 2009. **5**(1): p. 2-3.
170. Tomalia, D.A., *In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience*. J Nanopart Res, 2009. **11**(6): p. 1251-1310.
171. Ugelstad, J., M.S. Elaasser, and Vanderho.Jw, *Emulsion Polymerization - Initiation of Polymerization in Monomer Droplets*. Journal of Polymer Science Part C- Polymer Letters, 1973. **11**(8): p. 503-513.
172. Landfester, K., *Polyreactions in miniemulsions*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. **22**(12): p. 896-936.
173. Landfester, K., *Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles*. Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(25): p. 4488-4507.

174. Solanki, A., J.D. Kim, and K.B. Lee, *Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging*. Nanomedicine (Lond), 2008. **3**(4): p. 567-78.
175. Zhu, J., L. Zhou, and F. XingWu, *Tracking neural stem cells in patients with brain trauma*. N Engl J Med, 2006. **355**(22): p. 2376-8.
176. Arbab, A.S., et al., *Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells*. NMR Biomed, 2005. **18**(8): p. 553-9.
177. Janic, B., et al., *Effects of ferumoxides-protamine sulfate labeling on immunomodulatory characteristics of macrophage-like THP-1 cells*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2499.
178. Maxwell, D.J., et al., *Fluorophore-conjugated iron oxide nanoparticle labeling and analysis of engrafting human hematopoietic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 517-24.
179. Schmidtke-Schrezenmeier, G., et al., *Labeling of mesenchymal stromal cells with iron oxide-poly(L-lactide) nanoparticles for magnetic resonance imaging: uptake, persistence, effects on cellular function and magnetic resonance imaging properties*. Cytotherapy, 2011. **13**(8): p. 962-75.
180. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-44.
181. Rosen, A.B., et al., *Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2128-38.
182. Lei, Y., et al., *Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(2): p. 421-7.
183. Beyersmann, D. and S. Hechtenberg, *Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **144**(2): p. 247-61.
184. Anas, A., et al., *Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS quantum dots*. Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(32): p. 10005-11.
185. Stohs, S.J. and D. Bagchi, *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(2): p. 321-36.
186. Prakash, A.S., K.S. Rao, and C.T. Dameron, *Cadmium inhibits BPDE alkylation of DNA in the major groove but not in the minor groove*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(1): p. 198-203.
187. Kutsuzawa, K., et al., *Surface functionalization of inorganic nano-crystals with fibronectin and E-cadherin chimera synergistically accelerates trans-gene delivery into embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(3): p. 514-20.
188. Kutsuzawa, K., T. Akaike, and E.H. Chowdhury, *The influence of the cell-adhesive proteins E-cadherin and fibronectin embedded in carbonate-apatite DNA carrier on transgene delivery and expression in a mouse embryonic stem cell line*. Biomaterials, 2008. **29**(3): p. 370-6.
189. Langer, R., et al., *Human embryoid bodies containing nano- and microparticulate delivery vehicles*. Advanced Materials, 2008. **20**(12): p. 2285-+.
190. Sullivan, C.O. and C. Birkinshaw, *In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4375-82.

191. Jiao, Y., et al., *In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-5.
192. Alvarez-Roman, R., et al., *Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles*. Pharm Res, 2004. **21**(10): p. 1818-25.
193. Alvarez-Roman, R., et al., *Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles*. J Control Release, 2004. **99**(1): p. 53-62.
194. Yadav, S.C., A. Kumari, and R. Yadav, *Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation*. Peptides, 2011. **32**(1): p. 173-87.
195. Posadas, I., F.J. Guerra, and V. Cena, *Nonviral vectors for the delivery of small interfering RNAs to the CNS*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(8): p. 1219-36.
196. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
197. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
198. Decuzzi, P. and M. Ferrari, *The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles*. Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2915-22.
199. Gao, H., W. Shi, and L.B. Freund, *Mechanics of receptor-mediated endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9469-74.
200. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 662-8.
201. Ferreira, L., et al., *New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(2): p. 136-46.
202. Desai, M.P., et al., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent*. Pharm Res, 1997. **14**(11): p. 1568-73.
203. Chithrani, B.D. and W.C. Chan, *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1542-50.
204. Yoo, J.W., N. Doshi, and S. Mitragotri, *Endocytosis and Intracellular Distribution of PLGA Particles in Endothelial Cells: Effect of Particle Geometry*. Macromol Rapid Commun, 2010. **31**(2): p. 142-8.
205. Fleck, C.C. and R.R. Netz, *Electrostatic colloid-membrane binding*. Europhysics Letters, 2004. **67**(2): p. 314-320.
206. Park, E.K., et al., *Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery*. J Control Release, 2005. **109**(1-3): p. 158-68.
207. Nordstrom, J.L., *Plasmid-based gene transfer and antiprogesterin-controllable transgene expression*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2003(43): p. 225-44.
208. Parak, W.J., et al., *Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method to investigate particle uptake by cells*. Small, 2006. **2**(3): p. 394-400.
209. Mailander, V., et al., *Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents*. Mol Imaging Biol, 2008. **10**(3): p. 138-46.

210. Landfester, K., et al., *Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2005. **206**(24): p. 2440-2449.
211. Lorenz, M.R., et al., *Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells*. Biomaterials, 2006. **27**(14): p. 2820-8.
212. Cedervall, T., et al., *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2050-5.
213. Linse, S., et al., *Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8691-6.
214. Lundqvist, M., et al., *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14265-70.
215. Lorenz, M.R., et al., *Synthesis of fluorescent polyisoprene nanoparticles and their uptake into various cells*. Macromol Biosci, 2008. **8**(8): p. 711-27.
216. Miaczynska, M., L. Pelkmans, and M. Zerial, *Not just a sink: endosomes in control of signal transduction*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(4): p. 400-406.
217. Iversen, T.G., et al., *Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands*. Nano Letters, 2008. **8**(7): p. 1858-1865.
218. Huang, X., et al., *The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6142-53.
219. Degorce, F., et al., *HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications*. Curr Chem Genomics, 2009. **3**: p. 22-32.
220. Zeiss, *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*.
221. Dean Fraga , S.F., *Real - Time PCR*. Current Protocols, 2008.
222. BioRad, *CFX Manager Handbook*.
223. Pittenger, M.F., *Mesenchymal stem cells from adult bone marrow*. Methods Mol Biol, 2008. **449**: p. 27-44.
224. Komor, M., et al., *Transcriptional profiling of human hematopoiesis during in vitro lineage-specific differentiation*. Stem Cells, 2005. **23**(8): p. 1154-69.
225. Ivonne Brüstle, K.L.u.V.M., *Influence of polymeric nanoparticles on the differentiation of human mesenchymal stem cells*. in Vorbereitung.
226. Holzapfel, V., et al., *Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2005. **206**(24): p. 2440-2449.
227. Urban, M., A. Musyanovych, and K. Landfester, *Fluorescent Superparamagnetic Polylactide Nanoparticles by Combination of Miniemulsion and Emulsion/Solvent Evaporation Techniques*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2009. **210**(11): p. 961-970.
228. Musyanovych, A., et al., *Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects*. Acta Biomater, 2011. **7**(12): p. 4160-8.
229. Dausend, J., *Dissertation*. 2009.

230. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 585-92.
231. Neenu Shingh, G.J.S.J., Romisa Adadi and Shareen H. Doak, *Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Nano Reviews 2010, 2010. **1**.
232. Gutteridge, J.M., D.A. Rowley, and B. Halliwell, *Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids*. Biochem J, 1982. **206**(3): p. 605-9.
233. Greulich, C., et al., *Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)*. Langenbecks Arch Surg, 2009. **394**(3): p. 495-502.
234. Hackenberg, S., et al., *Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells*. Toxicol Lett, 2011. **201**(1): p. 27-33.
235. Gojova, A., et al., *Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: Effect of particle composition*. Environmental Health Perspectives, 2007. **115**(3): p. 403-409.
236. Habijan, T., et al., *Influence of nickel ions on human multipotent mesenchymal stromal cells (hMSCs)* *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2007. **38**(12).
237. Augello, A. and C. De Bari, *The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(10): p. 1226-38.
238. Kim, W.K., et al., *Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress*. Journal of Cellular Biochemistry, 2010. **111**(5): p. 1199-209.
239. Plaisant, M., et al., *Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 703-13.
240. Tautzenberger, A., et al., *Effect of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on mesenchymal stem cell differentiation*. Biomaterials, 2010. **31**(8): p. 2064-2071.
241. Huang, D.M., et al., *Internalization of mesoporous silica nanoparticles induces transient but not sufficient osteogenic signals in human mesenchymal stem cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **231**(2): p. 208-15.
242. Balakumaran, A., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their "stemness"*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11462.
243. Chen, Y.C., et al., *The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **245**(2): p. 272-9.
244. Gupta, A.K. and A.S.G. Curtis, *Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2004. **15**(4): p. 493-496.

245. Lorenz, M.R., et al., *Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells*. *Biomaterials*, 2006. **27**(14): p. 2820-2828.
246. Ivonne Brüstle, K.L.u.V.M., *Hematopoietic stem cells and polymeric nanoparticles - particle uptake and lineage differentiation*. In Vorbereitung.
247. Zhang, W.W., L. Nie, and G. Wu, *Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: A multiple regression to identify sources of variations*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **339**(2): p. 603-610.
248. Aebersold, R., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(3): p. 1720-1730.
249. Janic, B., et al., *Optimization and validation of FePro cell labeling method*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5873.
250. Daldrup-Link, H.E., et al., *Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents*. *Radiology*, 2003. **228**(3): p. 760-7.
251. Bregoli, L., et al., *Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines*. *Toxicology*, 2009. **262**(2): p. 121-9.
252. Bulte, J.W.M. and D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*. *Nmr in Biomedicine*, 2004. **17**(7): p. 484-499.
253. Weissleder, R., et al., *Ultrasmlal Superparamagnetic Iron-Oxide - Characterization of a New Class of Contrast Agents for Mr Imaging*. *Radiology*, 1990. **175**(2): p. 489-493.
254. Shapiro, E.M., et al., *In vivo detection of single cells by MRI*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2006. **55**(2): p. 242-249.
255. Anderson, S.A., et al., *Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 420-425.
256. Iwanami, A., et al., *Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates*. *Journal of Neuroscience Research*, 2005. **80**(2): p. 182-190.
257. Frank, J.A., et al., *Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents*. *Academic Radiology*, 2002. **9**: p. S484-S487.
258. Arbab, A.S., et al., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI*. *Blood*, 2004. **104**(4): p. 1217-1223.
259. Ferrucci, J.T. and D.D. Stark, *Iron-Oxide Enhanced Mr-Imaging of the Liver and Spleen - Review of the 1st-5 Years*. *American Journal of Roentgenology*, 1990. **155**(5): p. 943-950.
260. Bulte, J.W.M. and D.L. Kraitchman, *Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2004. **5**(6): p. 567-584.
261. Liu, W. and J.A. Frank, *Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI*. *European Journal of Radiology*, 2009. **70**(2): p. 258-264.
262. Heyn, C., et al., *Detection threshold of single SPIO-Labeled cells with FIESTA*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2005. **53**(2): p. 312-320.
263. Dahnke, H. and T. Schaeffter, *Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T-2* relaxometry*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2005. **53**(5): p. 1202-1206.

264. Rad, A.M., et al., *Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods*. Biotechniques, 2007. **43**(5): p. 627-+.
265. Kraitchman, D.L. and J.W.M. Bulte, *Imaging of stem cells using MRI*. Basic Research in Cardiology, 2008. **103**(2): p. 105-113.

13 Publikationen

Brüstle Ivonne, Landfester Katharina, Mailänder Volker

Influence of polymeric nanoparticles on the differentiation of human mesenchymal stem cells.

eingereicht

Brüstle Ivonne, Landfester Katharina, Mailänder Volker

Hematopoietic stem cells and polymeric nanoparticles - particle uptake and lineage differentiation.

in Vorbereitung

Posterbeitrag

Ivonne Brüstle, Anna Musvyanovych, Markus Urban, Katharina Landfester, Volker Mailänder

Influence of polymeric nanoparticles on the differentiation of stem cells.

Polymers in Medicine and Biology: 2011,
September 2011, Santa Rosa, Kalifornien

14 Eidesstaatliche Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von November 2009 bis Dezember 2011 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz sowie in der III. Medizinischen Klinik Mainz in der AG Mailänder durchgeführt.

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Doktorarbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Mainz, den

Ivonne Brüstle

„