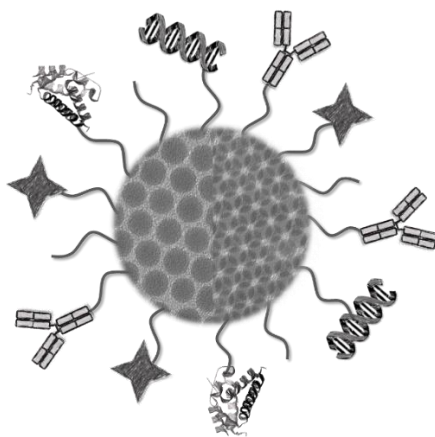


# Synthese und Biofunktionalisierung von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie



## Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Anna-Maria Schilmann

geboren in Neuwied  
Mainz, 2014



Dekan: [REDACTED]

Erster Berichterstatter: [REDACTED]

Zweiter Berichterstatter: [REDACTED]

Datum der mündlichen Prüfung: 01.10.2014



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2011 bis Oktober 2014 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Tremel an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie angefertigt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

*A. Schilman*

Mainz, 04.08.2014



*Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen,  
durch die sie entstanden sind.*

*Albert Einstein*





## **Kurzzusammenfassung**

Auf dem Gebiet der Krebsimmuntherapie kommen immer mehr nanopartikuläre Systeme zum Einsatz. Sie sollen neben der Chemotherapie und der Bestrahlung die Chirurgie bei der Krebsbekämpfung unterstützen. Wünschenswert wäre der Ersatz beider systemischen Therapien durch eine ausschließlich lokale Anwendung. Durch die Ausstattung der Nanopartikel mit spezifischen Zielvektoren zur Zellansteuerung soll solch eine lokale Therapie gewährleistet werden. Weiterhin sollen die Partikel als Transporter für Wirkstoffe oder auch „Informationen“ für das Immunsystem zur Bekämpfung von Krankheiten dienen. Durch die Verwendung von Metall- oder Metalloxidnanopartikeln ist gleichzeitig ein Kontrastmittel für bildgebende Verfahren gegeben, wobei auch andere Partikel mit bildgebenden Liganden funktionalisiert werden können. Besonderes Interesse haben Silica und auf Silica basierende Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Toxizität, guten Löslichkeit, hohen Biokompatibilität und guten Modifizierbarkeit geweckt. Sie können gut mit weiteren Materialien kombiniert werden, um ihre Vielseitigkeit zu erhöhen. Silica kann in verschiedenen Morphologien und Strukturen (mesoporös) dargestellt werden, was ein breites Anwendungsgebiet ermöglicht. Über eine Silanankergruppe können funktionelle Liganden auf die Oberfläche der Partikel kovalent gebunden werden, was zu einem stabilen System für die biomedizinische Anwendung führt.

Der Fokus dieser Arbeit lag somit darauf verschiedene Silica und auf Silica basierende Nanopartikel zu synthetisieren und für verschiedene Anwendungen in der Krebsimmuntherapie und Krebstherapie zu modifizieren. Dazu wurde vor allem untersucht, wie verschiedene Zellen des Immunsystems auf die Partikel reagieren, ob es möglich ist, komplexe Strukturen wie Proteine an die Partikel zu binden ohne deren Bioaktivität zu beeinträchtigen, und ob eine Bindung der Partikel an Tumorzellen zur Kontrastierung ausgenutzt werden kann.

## **Abstract**

In the field of cancer immunotherapy more and more nanoparticle systems are being used. In addition to chemotherapy and irradiation, they are meant to assist/support surgery. The replacement of both systemic therapies by a local application/therapy would be desirable. By equipping the nanoparticles with specific target vectors for cells, such a local therapy could be realized. Furthermore, the particles can be used as carriers for pharmaceuticals or as "information carriers" to aid the immune system in fighting disease.

Using metal or metal oxide nanoparticles also provides a contrast agent for imaging such as MRI/CT. Other particles can be functionalized with imaging ligands for applications in PET, for example. Silica and silica-based nanoparticles are of high interest due to their low toxicity, good solubility, high biocompatibility and good modifiability. They can easily be combined with other materials to increase their versatility. Silica can occur in different morphologies and structures (mesoporous), allowing a wide range of applications. Using a silane anchor, functional ligands can be covalently bound to the surface of the particles, which leads to a stable system for biomedical applications.

The focus of this work was thus to synthesize and modify different silica and silica-based nanoparticles for various applications, such as cancer immunotherapy and cancer treatment. Studies mainly explored how the varying cells of the immune system reacted to the nanoparticle treatment. Further investigations addressed whether it is possible to bind complex structures, such as proteins, to the particle surface without losing bioactivity, as well as if particles bound to tumor cells could be used as contrast agents.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Grundlagen .....	5
2.1	Die Welt der Nanopartikel .....	5
2.2	Herstellungsverfahren .....	7
2.2.1	Thermische Zersetzung.....	10
2.2.2	Solvothermalsynthese .....	12
2.2.3	Fällungsreaktion und Sol-Gel-Prozess .....	12
2.3	Krebsimmuntherapie .....	14
2.3.1	Immunsystem.....	14
2.3.2	Krebs.....	16
2.3.3	Ansteuerung von Zellen mit Hilfe von Nanopartikeln .....	17
2.3.3.1	Passive Zellansteuerung.....	19
2.3.3.2	Aktive Zellansteuerung.....	20
3	Herstellung der Nanopartikel.....	25
3.1	Metall- und Metalloxidnanopartikel .....	25
3.1.1	Einführung und Theorie.....	25
3.1.1.1	Isotrope Nanopartikel.....	25
3.1.1.2	Heterodimerpartikel .....	26
3.1.2	Ergebnisse und Diskussion.....	28
3.1.2.1	Manganoxidnanopartikel .....	28
3.1.2.2	Pt-Nanopartikel .....	30
3.1.2.3	Heterodimere.....	31
3.1.3	Zusammenfassung .....	32
3.2	Siliziumdioxidnanopartikel.....	34
3.2.1	Einführung und Theorie.....	34
3.2.1.1	Stabilisierung von SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln in Lösung .....	40
3.2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	41
3.2.2.1	SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel nach Stöber.....	41

3.2.2.2	SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel über die reverse Mikroemulsion .....	46
3.2.2.3	Mesoporöse SiO <sub>2</sub> -Partikel .....	49
3.2.3	Zusammenfassung .....	59
3.3	Metall- und Metalloxidpartikel in Kombination mit SiO <sub>2</sub> .....	60
3.3.1	Einführung und Theorie .....	60
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	62
3.3.2.1	MnO@SiO <sub>2</sub> und MnO@mSiO <sub>2</sub> .....	62
3.3.2.2	Pt@MnO@SiO <sub>2</sub> .....	69
3.3.2.3	Au@ZnO@SiO <sub>2</sub> .....	71
3.3.2.4	Pt@SiO <sub>2</sub> .....	72
3.3.3	Zusammenfassung .....	80
4	Direkte und Indirekte Tumorabwehr mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln.....	81
4.1	Einführung und Theorie.....	81
4.1.1	Grundlagen .....	82
4.1.1.1	Direkte Tumorabwehr mit Hilfe des Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	82
4.1.1.2	Indirekte Tumorabwehr mit Hilfe von Interleukin-2.....	84
4.1.1.3	ELISA .....	87
4.1.1.4	Kopplungsmechanismus für die Bindung der Zytokine an die SiO <sub>2</sub> -NP .....	88
4.1.1.5	Aufgabe.....	89
4.2	Ergebnisse und Diskussion .....	90
4.2.1	SiO <sub>2</sub> -TNF $\alpha$ -Partikel.....	90
4.2.2	SiO <sub>2</sub> -IL-2-Partikel .....	95
4.2.3	SiO <sub>2</sub> -siRNA-Partikel .....	96
4.2.3.1	Polyethylenimin Funktionalisierung.....	97
4.2.3.2	siRNA-Funktionalisierung.....	97
4.3	Zusammenfassung .....	100
5	Fluoreszenzmarkierte Silicananopartikel zur Tumorrandkontrastverstärkung von Kopf-Hals-Tumoren .....	103
5.1	Einführung und Theorie.....	103
5.1.1	Grundlagen .....	105
5.1.1.1	Konfokales Laserendoskop.....	105

5.1.1.2	Kopf-Hals-Karzinom und EGF-Rezeptor .....	105
5.1.1.3	Aufbau und Kopplung eines Antikörper .....	107
5.1.1.4	Aufgabe .....	108
5.2	Ergebnisse und Diskussion .....	110
5.2.1.1	Einzelzellexperimente .....	112
5.2.1.2	Experimente an entnommenen Gewebeproben .....	115
5.3	Zusammenfassung .....	119
6	Einfluss von Silicananopartikeln auf DCs, Makrophagen und Mastzellen .....	121
6.1	Einführung und Theorie .....	121
6.1.1	Grundlagen .....	121
6.1.1.1	Dendritische Zellen .....	123
6.1.1.2	Makrophagen .....	126
6.1.1.3	Mastzellen .....	126
6.1.1.4	Modellantigen .....	128
6.1.1.5	FACS .....	129
6.1.1.6	Aufgabe .....	130
6.2	Ergebnisse und Diskussion .....	131
6.2.1	Mastzellen .....	131
6.2.1.1	Weitere Ergebnisse und Ausblick .....	136
6.2.2	Dendritische Zellen .....	137
6.2.2.1	Aufnahme der Partikel in Zellen .....	137
6.2.2.2	Einfluss der Nanopartikel auf den Reifeprozess der DCs .....	142
6.2.2.3	Einfluss der Nanopartikel auf die Antigenaufnahme von DCs .....	143
6.2.2.4	Einfluss von Ovalbumin auf die Partikelaufnahme der Zellen .....	144
6.2.2.5	Rezeptorabhängige Aufnahme der Nanopartikel .....	145
6.2.3	Makrophagen vs. dendritische Zellen .....	148
6.3	Zusammenfassung .....	150
7	Zusammenfassung und Ausblick .....	153
8	8 Experimenteller Teil und Methoden .....	157
8.1	Experimenteller Teil .....	157
8.1.1	Pt-Partikel .....	158

8.1.2	FePt.....	158
8.1.3	Mangan(II)-Oleat.....	159
8.1.4	MnO <sup>[28]</sup> .....	159
8.1.5	MnO <sub>2</sub> .....	160
8.1.6	Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	160
8.1.7	Pt/FePt@MnO .....	160
8.1.8	SiO <sub>2</sub> über den klassischen Weg nach Stöber.....	161
8.1.9	SiO <sub>2</sub> über die reverse Mikroemulsion .....	162
8.1.10	mSiO <sub>2</sub> .....	162
8.1.11	mSiO <sub>2</sub> @SiO <sub>2</sub> <sup>[114]</sup> .....	163
8.1.12	mSiO <sub>2</sub> -Nanorods <sup>[115], [116]</sup> .....	163
8.1.13	MnO@SiO <sub>2</sub> .....	164
8.1.14	MnO@mSiO <sub>2</sub> .....	164
8.1.15	Hohle mSiO <sub>2</sub> .....	164
8.1.16	Au@ZnO@SiO <sub>2</sub> .....	165
8.1.17	Pt@MnO@SiO <sub>2</sub> .....	165
8.1.18	Pt@SiO <sub>2</sub> .....	165
8.1.19	Porenerweiterung von mSiO <sub>2</sub> .....	166
8.1.20	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .....	166
8.1.21	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -FITC .....	166
8.1.22	SiO <sub>2</sub> -PEI.....	167
8.1.23	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> /siRNA und SiO <sub>2</sub> -PEI/siRNA.....	167
8.1.24	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -TNF $\alpha$ /IL-2.....	167
8.1.25	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -Antikörper .....	168
8.1.25.1	SiO <sub>2</sub> -EGF .....	168
8.1.25.2	SiO <sub>2</sub> -DEC205/Isotype Control.....	168
8.1.26	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -CpG/Ovalbumin .....	169
8.1.26.1	SiO <sub>2</sub> -CpG .....	169
8.1.26.2	SiO <sub>2</sub> -Ovalbumin.....	169
8.1.26.3	SiO <sub>2</sub> -Ovalbumin/CpG .....	169

8.2	Methoden .....	170
8.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie .....	170
8.2.2	UV-Vis-Spektroskopie .....	170
8.2.3	Pulverröntgendiffraktometrie .....	170
8.2.3.1	D8-Advance .....	170
8.2.3.2	D8-Discover .....	171
8.2.4	Zetasizer .....	171
8.2.5	IR-Spektroskopie .....	171
8.2.6	ELISA .....	171
	Anhang .....	I
A.	Abkürzungsverzeichnis .....	I
B.	Literaturverzeichnis .....	IVV
C.	Abbildungsverzeichnis .....	XIV
D.	Tabellenverzeichnis .....	XXII
E.	Zusätzliche Ergebnisse .....	XXIII
E.1	Hohle mSiO <sub>2</sub> -Nanopartikel .....	XXII
E.2	Stäbchenförmige mSiO <sub>2</sub> .....	XXII
E.3	FePt@MnO .....	XXIV
E.4	Au@SiO <sub>2</sub> -Heterodimer .....	XXIV
E.5	Einfluss verschiedener Rezeptoren auf die Aufnahme von SiO <sub>2</sub> -Partikeln in DCs und Makrophagen .....	XXV
E.6	Toxizitätsstudien von DEC205 gekoppelten SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln .....	XXXII
E.7	Manuskript: "Silica-Coated Au@ZnO Janus Particles and Their Stability in Epithelial Cells" .....	XXXIII
E.8	Manuskript: "Magnetic behavior of MnO and heterodimer FePt@MnO-NPs" .....	LI





# Kapitel 1

## Einleitung

Die Medizin ist ein stetig wachsender Forschungsbereich, der sich sehr schnell weiterentwickelt und verbessert. Trotz dieser Dynamik sind viele Krankheiten, wie auch Krebs immer noch eine große Herausforderung für die Schulmedizin. Bei der zweithäufigsten Todesursache der westlichen Welt stoßen Forscher und Mediziner bisher an viele Grenzen. In den letzten Jahren wurden viele Strategien zur Heilung dieser Krankheit erforscht und entwickelt. Hierzu gehören vor allem die Chemotherapie, die Chirurgie und die Bestrahlung des krankhaften, körpereigenen Gewebes. Besonderes Interesse hat auf diesem Gebiet die Krebsimmuntherapie geweckt. Im Grunde besitzt unser Körper eine eigene Abwehr, um diese krankhaften Zellen zu eliminieren. Dafür zuständig ist das Immunsystem, dem für derartige Prozesse verschiedene Abwehrzellen wie T-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen und Abwehrmechanismen zur Verfügung stehen. Damit ist es in der Lage, Bakterien, Viren, alte und defekte körpereigene Zellen und andere Pathogene selbstständig abzutöten und abzubauen. Durch Mutationen und andere Wege kann es allerdings passieren, dass das Immunsystem diese nicht erkennt und somit nicht bekämpfen kann. Es kommt dann zu unkontrollierter Verbreitung und Wachstum von Tumoren im Körper. Bei der Bekämpfung dieser Problematik soll unser Immunsystem unterstützt werden. Hierzu gibt es bereits etliche

Arbeiten aus dem Bereich der Immunologie und Chemie die zum einen versuchen die Wege unseres Immunsystems genau zu verstehen und zum anderen von außen einzugreifen um die Immunabwehr zu verbessern. <sup>[1], [2], [3]</sup>

Zu dieser Unterstützung des Immunsystems von außen wird der Einsatz von anorganischen Nanopartikeln erforscht. Dazu werden die Partikel mit einer spezifischen Zielstruktur, die an bestimmte Zellen der Immunabwehr oder direkt an Tumorzellen binden kann, sowie mit bestimmten Signal- oder Wirkstoffen ausgestattet. So kann unter anderem eine lokale Therapie mit Chemotherapeutika erfolgen, die eine erhöhte systemische Belastung auf den ganzen Körper verringert. Bei der gezielten Ansteuerung von Immunzellen, kann das Nanopartikel zusätzlich mit einem tumorassoziierten Antigen gekoppelt werden, welches dann dem Immunsystem zur Verfügung steht um körpereigene Abwehrmechanismen in die Wege zu leiten. Hier kann in der Literatur ein großes Interesse an magnetischen Nanopartikeln, wie Eisenoxidpartikeln verfolgt werden. <sup>[4], [5]</sup> Aber auch SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel oder auf SiO<sub>2</sub> basierende Nanopartikel kommen in diesem Bereich zum Einsatz. Bei den hier eingesetzten Silica basierenden Nanopartikeln handelt es sich um Kern-Schale- oder Heterodimerpartikel, deren Schale, bzw. eine Domäne aus Silica besteht.

In den letzten Jahren ist das Interesse an Silicananopartikeln zur Anwendung in der Medizin und Biomedizin bemerkenswert gestiegen. Zu nennende Gründe hierfür sind ihre geringe Toxizität, ihre beachtliche Biokompatibilität und Stabilität, sowie ihre große Vielfältigkeit in Morphologie, Struktur, Größe und Funktionalisierbarkeit. Diese besonderen biomedizinischen Eigenschaften konnten bereits in zahlreichen *in vitro* und auch *in vivo* Studien bewiesen werden. Unlösliche oder instabile Wirkstoffe stellen in der (Krebs-) Therapie immer noch große Probleme dar. Silicananopartikel besitzen das Potential bisherige therapeutische Systeme zu verbessern bzw. in ihrer Effektivität zu steigern. <sup>[6], [7], [8]</sup> Hier ist nicht nur die Möglichkeit der Einbringung von hydrophoben Wirkstoffen in hydrophile Nanopartikel zu nennen, die dadurch in den Körper gebracht werden können. Nanopartikel als Transportsysteme ermöglichen auch eine spezifische Zielansteuerung von unterschiedlichen Geweben und Zellen und eine damit verbundene „vor Ort Freigabe“ der Pharmazeutika. Diese Lokalisierung kann auch für die bildgebende Verfahren und die Darstellung von Tumoren ausgenutzt werden. <sup>[9]</sup>

---

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und der Funktionalisierung von Silica- und Silica basierenden Nanopartikeln zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie und anderen biomedizinischen Bereichen.

Hierzu sollen Silicapartikel, Silica-Kern-Schale-Partikel und Silica-Heterodimerpartikel in verschiedenen Größen und Morphologien hergestellt, funktionalisiert, charakterisiert und zunächst auf ihre Zytotoxizität untersucht werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Anwendung von sphärischen Silicananopartikeln in verschiedenen Bereichen der Krebsimmuntherapie und der direkten Tumoransteuerung zur Visualisierung und Bekämpfung des krankhaften Gewebes. Dazu sollen die Einflüsse der reinen und funktionalisierten Partikel auf verschiedene Zellen des Immunsystems untersucht werden, eine Fluoreszenzmarkierung von Tumorgewebe mit den Partikeln getestet und die direkte Bekämpfung des Tumors, mit Hilfe von zytokinmarkierten Partikeln gezeigt werden.



# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Die Welt der Nanopartikel

Nanopartikel, Teilchen im Größenbereich von 1 – 100 nm, zusammengesetzt aus einzelnen Atomen oder Molekülen kommen heutzutage in etlichen Anwendungsbereichen zum Einsatz. Sie werden gezielt im Labormaßstab oder auch großtechnisch synthetisch hergestellt. Was die Anwendung von Nanopartikeln so besonders interessant macht ist ihre geringe Größe und die mit ihr einhergehenden veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Materialien. So zeigen Goldnanopartikel eine Plasmonenresonanz, durch die sie spektroskopisch sichtbar sind <sup>[10]</sup> oder Platinnanopartikel sind Katalyse aktiv und können so in der Katalysatortechnik eingesetzt werden. <sup>[11]</sup> Beide Materialien gehören zu den schweren Elementen im Periodensystem und eignen sich als röntgenstrahlabschwächendes Material und können daher als Kontrastmittel in der Computertomographie zum Einsatz kommen. <sup>[12], [13]</sup> Ein weiteres sehr großes Feld in der Nanotechnologie ist die Oberflächenbeschichtung von verschiedenen Materialien.

Das wohl bekannteste Beispiel ist der technisch nachgestellte Lotus-Effekt, um zum Beispiel schmutzabweisende Oberflächen zu erschaffen. <sup>[14], [15]</sup>

In diesen breitgefächerten Anwendungsgebieten werden die physikalischen Eigenschaften der Nanopartikel ausgenutzt, die sie gerade aus dem Grund besitzen, weil sie so klein sind. Eine wichtige größenabhängige Eigenschaft ist der Magnetismus, so ist zum Beispiel Eisenoxid als Bulk-Material ferrimagnetisch, als Nanomaterial aber superparamagnetisch. Wird solch ein Material immer weiter verkleinert, wird irgendwann das Einzeldomänenlimit und das superparamagnetische Limit unterschritten. Das Partikel besteht also nur noch aus einer einzelnen magnetischen Domäne und zeigt somit nach außen hin eine andere Magnetisierung als das entsprechende Bulk-Material. Dieser Effekt, wird für den Einsatz von Nanopartikeln als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie ausgenutzt. Am weitesten verbreitet sind hier wohl Eisenoxidnanopartikel, aber auch Manganoxid- und gadoliniumhaltige Partikel eignen sich in diesem Einsatzgebiet. <sup>[16], [17], [18]</sup>

Mit eines der mittlerweile größten Anwendungsgebiete für Nanopartikel ist die biomedizinische Anwendung. Hier können unter anderem die bereits erwähnten physikalischen Eigenschaften der Partikelkerne zur Bildgebung ausgenutzt werden und so einen großen Beitrag zur Diagnose von Tumoren leisten. Aber auch andere bildgebende Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie können mit Hilfe von speziellen Liganden, die auf die Partikel aufgebracht werden, verwendet werden. Neben der Unterstützung der Bildgebung sollen die Partikel aber auch als Wirkstofftransporter dienen, in dem sie die benötigten Pharmazeutika lokal freisetzen können um eine globale Belastung des Körpers zu vermeiden. Gerade hier ist es wichtig, dass Nanopartikel von derselben Größe und Form hergestellt werden können, da bereits relativ geringe Größenunterschiede eine veränderte Bindung oder Aufnahme bei Zellen auslösen können. Genauso ist eine sehr gute Löslichkeit in Wasser, bzw. Serum unabdingbar für die Anwendung von Nanopartikeln in der Biomedizin. Streng genommen sind Nanopartikel in einer Lösung allerdings gar nicht gelöst, sondern lediglich dispergiert. Oftmals wird dennoch von einer Lösung gesprochen, hier ist eine stabile Dispersion der Partikel gemeint, die über einen langen Zeitraum nicht zusammen bricht. Viele Nanopartikel sind aufgrund der Syntheseroute nur in unpolaren Lösungsmitteln dispergierbar, diese müssen vor einer biomedizinischen Anwendung zunächst „umfunktionalisiert“ werden.

Die Löslichkeit der Partikel kommt durch bestimmte Oberflächenliganden zustande, die mit einem spezifischen Anker auf die Partikeloberfläche binden können und deren anderes Ende hydrophil oder hydrophob ist. Für die biomedizinische Anwendung werden hydrophile Nanopartikel benötigt, die durch eine Ligandenaustauschreaktion erhalten werden können. Oftmals verwendete Liganden in diesem Einsatzgebiet, basieren auf Polyethylenglykolen (PEG) und tragen unterschiedliche Anker- und funktionelle Gruppen. Diese wasserlöslichen Nanopartikel können dann je nach Wunsch und Einsatzgebiet mit weiteren Zielstrukturen versehen werden. Das genaue Vorgehen hierzu wird in den Kapiteln 4-6 beschrieben. Bevor die Nanopartikel allerdings ihre Spezifität erhalten und zur Anwendung gebracht werden können, müssen sie synthetisiert werden. Im Weiteren werden verschiedene Herstellungsverfahren von Nanopartikeln vorgestellt.

## 2.2 Herstellungsverfahren

In vielen der angesprochenen Anwendungsgebiete, jedoch besonders in der biomedizinischen Anwendung ist eine sehr enge Größenverteilung der Nanopartikel erforderlich. Bei einer Größenstandardabweichung von unter 5% wird von einer hohen Monodispersität der Partikel gesprochen. Um eine so geringe Größenverteilung erreichen zu können, müssen die richtigen Reaktions- und Herstellungsbedingungen gewählt werden. Es gibt bereits viele großtechnische Herstellungsverfahren für Nanopartikel, <sup>[19]</sup> allerdings spielt die Herstellung im Labormaßstab immer noch eine übergeordnete Rolle, da hier die Größen- und Formkontrolle der Partikel leichter ist. Die Größe, die Morphologie und die Zusammensetzung von solchen Nanomaterialien lassen sich über verschiedenste Parameter, wie Temperatur, pH-Wert, Konzentration der Reaktanden, Art der Reaktion, Reaktionszeit und weiteren beeinflussen. Zunächst wird bei der Herstellung zwischen zwei Methoden unterschieden, der „*top-down*“- und der „*bottom-up*“-Methode. Bei der ersteren, auf die hier aber nicht vertiefend eingegangen werden soll, wird z.B. das entsprechende Bulk-Material mit Hilfe einer Kugelmühle bis in den Nanobereich zermahlen. Die „*bottom-up*“-Methode ist ein chemischer Prozess, bei dem

ausgehend von einzelnen Molekülen die gewünschten Nanopartikel oder Nanomaterialien gebildet werden. Hierzu werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Vorläufermoleküle zur Bildung der entsprechenden Partikel ausgenutzt. Hier soll auf die verschiedenen Herstellungsverfahren, wie die thermische Zersetzung, die Fällungsreaktion und die Solvothermalsynthese eingegangen werden, wobei es noch viele weitere Verfahren zur Darstellung von Nanomaterialien gibt. Zunächst muss aber der Grundmechanismus zum Wachstum von Nanopartikeln erläutert werden. LaMer und Dinegar entwickelten 1950 ein Modell, welches das Wachstum von Nanopartikeln, über einen kinetischen Ansatz erklärt.<sup>[20]</sup> Dieser kinetische Verlauf, also die Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit ist in Abbildung 1 dargestellt.

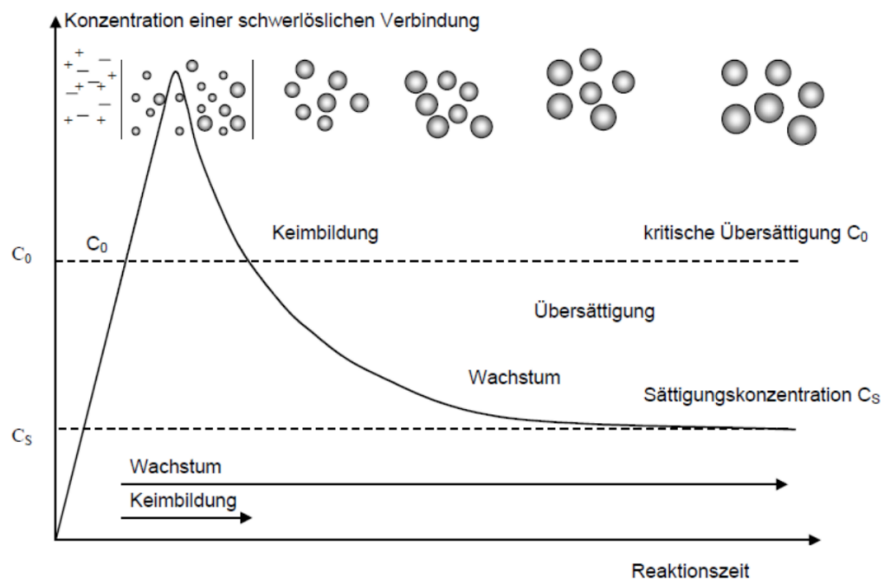


Abbildung 1: Modell von LaMer und Dinegar. Konzentrationsverlauf einer schwerlöslichen Verbindung von der Keimbildung bis hin zum Partikelwachstum.<sup>[20]</sup>

In der ersten Phase dieses Verlaufs werden über eine chemische Reaktion, aus den eingesetzten Vorläufermolekülen, über Bindungsspaltung die sogenannten Monomere gebildet. Da hier unter anderem die Bindungs- und Solvatationsenergien der Moleküle überwunden werden müssen, geht LaMer davon aus, dass es sich um einen endothermen Prozess handelt. Mit der Zeit steigt somit die Monomerkonzentration bis hin zu einer



kritischen Übersättigung  $C_0$  der Lösung. Ist diese kritische Konzentration überschritten, beginnt die Bildung von Keimen und mit dieser auch das Wachstum der Keime. Diese erste Phase, bis zum Einsetzen der Keimbildung, wird als Induktionszeit bezeichnet. Durch die Keimbildung fällt die Monomerkonzentration in Lösung wieder ab. Sobald diese wieder unter  $C_0$ , die kritische Übersättigung fällt, stoppt die Keimbildung und es findet nur noch Wachstum der vorhandenen Keime statt. Um möglichst monodisperse Partikelproben zu erhalten sollte die Keimbildungs- und die Wachstumsphase zeitlich möglichst voneinander getrennt vorliegen. Das Keimbildungsfenster sollte also relativ klein sein, damit die ersten Keime nicht schon wachsen, während noch weitere Keime entstehen.

Um solch eine Bildung von einzelnen Nanopartikeln gewährleisten zu können, müssen diese in Lösung stabilisiert werden. Ohne eine Stabilisierung würden die Partikel agglomerieren und zu größeren Partikeln wachsen, da dies energetisch günstiger wäre, was in Abbildung 2 zu sehen ist.

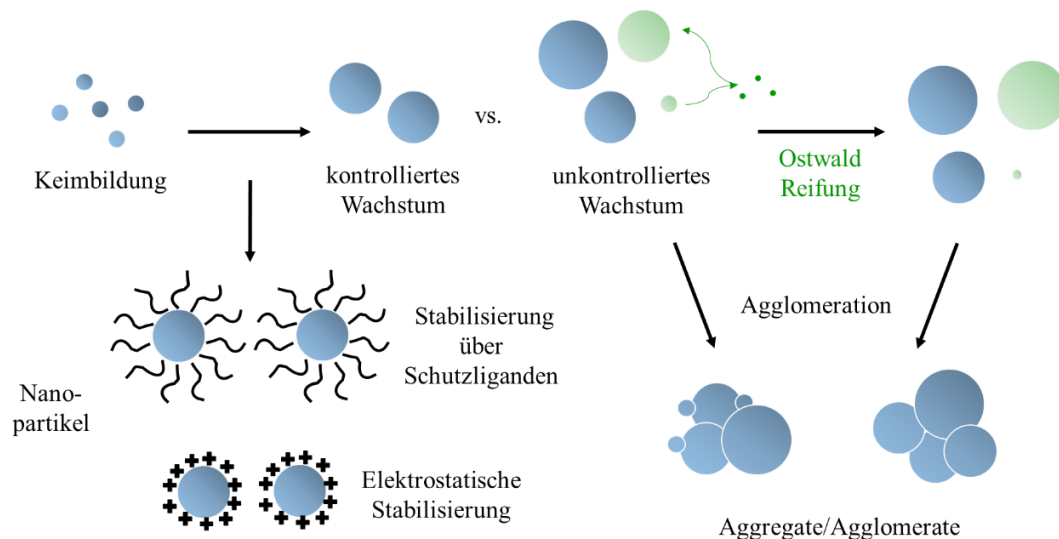


Abbildung 2: Schema zum Wachstum und zur Stabilisierung von Nanopartikeln.

Die Nanopartikel werden meistens durch sogenannte Schutzliganden in Lösung stabilisiert, deren eine Seite auf der Oberfläche der Partikel haften kann und deren andere Seite im hydrophoben oder hydrophilen löslich ist. So können die Partikel getrennt voneinander in einem entsprechenden Lösungsmittel vorliegen ohne weiter zu wachsen oder anschließend zu

agglomerieren. Dies muss nicht zwingend über Schutzliganden funktionieren, sondern kann auch elektrostatisch erfolgen. In Abbildung 2 ist neben dem monodispersen und polydispersen Wachstum und der Stabilisierung der Partikel auch noch die sogenannte Ostwaldreifung gezeigt.<sup>[21]</sup> Bei diesem Reifeprozess handelt es sich um einen selbst ablaufenden, kolloid-chemischen Prozess von dispersen Materialien. Hierbei lösen sich die kleineren Partikel auf und die freigesetzten Monomere lagern sich an größere Partikel an, die dadurch weiter anwachsen. Dies hat damit zu tun, dass die kleineren Partikel, mit ihrer starken Oberflächenkrümmung, einen größeren Dampfdruck (Gibbs-Thomson-Effekt)<sup>[22]</sup> besitzen, besser löslich sind und so im Vergleich zu den großen energetisch eher ungünstig sind. Schon bei kleinsten Größenunterschieden kann eine Ostwaldreifung einsetzen, so dass bei der Reaktion der genaue Zeitpunkt abgepasst werden muss, an dem das Partikelwachstum beendet ist und bevor eine starke Ostwaldreifung eintritt. Dieser Reifeprozess ist nicht gänzlich unerwünscht, da er eben auch zu gleichmäßigeren Proben beitragen kann, wenn das Wachstum beendet ist und immer noch kleine, unerwünschte Partikel vorliegen.

All diese Effekte liegen dem Partikelwachstum zugrunde, egal welches Herstellungsverfahren gewählt wird. Es sind allerdings nicht alle Herstellungsverfahren für alle Arten von Nanopartikeln geeignet, weshalb hier ein paar Möglichkeiten zur Synthese von Nanopartikeln vorgestellt werden sollen.

### **2.2.1 Thermische Zersetzung**

Diese Synthesemethode zur Darstellung von Metall- oder Metalloxidnanopartikeln beruht auf der Zersetzung von metallorganischen Vorläufermolekülen in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln. Neben dem Präkursor, zum Beispiel Platinacetylacetonat zur Darstellung von Platinanopartikeln<sup>[23]</sup> und dem Lösungsmittel, müssen noch die Schutzliganden zu der Synthese hinzugefügt werden um die entstehenden Partikel zu stabilisieren. Typische Schutzliganden für viele Metall- oder Metalloxidnanopartikel sind Oleylamin, welches mit seiner Aminogruppe besonders gut an Edelmetalloberflächen wie Platin binden kann und Ölsäure, welche gut an Oxide wie Eisen- oder Manganoxid binden kann. Manche Vorläufermoleküle,

wie Mangan(II)-Oleat, beinhalten den Schutzliganden direkt, welcher dann bei der Zersetzung frei wird und als Stabilisator fungiert. Über die Heizrate und die endgültige Reaktionstemperatur, die im Bereich von 150°C und 350°C liegt, kann die Morphologie und Größe der Partikel kontrolliert werden, da hierüber am besten die Steuerung eines kleinen Keimbildungsfensters funktioniert. Natürlich spielen hier aber auch die Präkursor- und Schutzligandenkonzentration und das Lösungsmittel eine Rolle. Bei der Wahl des Lösungsmittels geht es nicht nur um dessen Siedetemperatur um die gewünschte Reaktionstemperatur zu erreichen, sondern auch um dessen chemische Eigenschaften. Hier kommen zum Beispiel sehr unpolare Lösungsmittel wie Hexadecan oder 1-Octadecen zum Einsatz, aber auch „polarere“ Lösungsmittel wie Phenylether.

Eine besondere Variation der thermischen Zersetzung zur besseren Keimbildungskontrolle und somit Größenkontrolle der Partikel ist die sogenannte Heißinjektion.<sup>[24]</sup> Hierbei liegen das eigentliche Vorläufermolekül und die Schutzliganden bereits vor und bei einer erhöhten Temperatur, unterhalb der Zersetzungstemperatur des Vorläufermoleküls, wird ein Keimstarter hinzugegeben. Diese Methode wird zum Beispiel für die Bildung von Platinnanopartikeln (siehe Abbildung 3) eingesetzt<sup>[25]</sup>, wobei hier Eisenpentacarbonyl zur schlagartigen Keimbildung hinzugegeben wird.

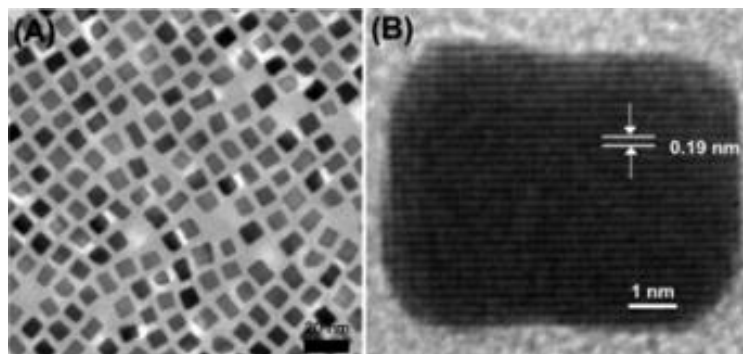


Abbildung 3: TEM-Aufnahmen von Platinnanopartikeln nach Wang *et al.* [25]

Über diese Methode kann das „zeitliche Keimbildungsfenster“, welches nach LaMer<sup>[20]</sup> beschrieben wurde, sehr kurz gehalten werden und es kann ein homogenes Wachstum der Partikel stattfinden. Zusätzlich können, über verschiedene „Keimstarter“, wie andere Carbonyle die Morphologien der Partikel beeinflusst bzw. kontrolliert werden.<sup>[26]</sup>

Auf diese Weise können verschiedenste Materialien in unterschiedlichste Morphologien gebracht werden. Neben den Nanowürfeln aus Abbildung 3 können auch Nadeln,<sup>[27]</sup> Sphären,<sup>[28]</sup> Dreiecke<sup>[29]</sup> und viele andere Formen gebildet werden.

## 2.2.2 Solvothermalsynthese

Da in dieser Arbeit die Solvothermalsynthese nicht zur direkten Herstellung von Nanopartikeln eingesetzt wurde, sondern nur zur Modifizierung von bereits fertigen Partikeln, siehe Kapitel 3.2.2.3, soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. Bei dieser Synthese kommen oftmals niedriger siedende polare Lösungsmittel wie Alkohole, Säuren und Basen oder Wasser (Hydrothermalsynthese) zum Einsatz. Dieses wird dann zusammen mit den Vorläufermolekülen in einen Autoklaven gegeben und unter hohem Druck, meist bis 200 bar, bei Temperaturen von 100-400°C behandelt. Oftmals tragen diese extremen Reaktionsbedingungen dazu bei, dass die eingesetzten Edukte besser in dem verwendeten Lösungsmittel löslich sind und somit eine Reaktion überhaupt erst möglich wird. Auf der anderen Seite können so häufig besondere Modifikationen und Formen der Materialien entstehen, die bei Normalbedingungen nicht entstehen würden.<sup>[30], [31], [32]</sup>

## 2.2.3 Fällungsreaktion und Sol-Gel-Prozess

Die Fällungsreaktion ist eine der am weitest verbreiteten Herstellungsverfahren zur Darstellung von Nanopartikeln. Hierbei werden die gelösten Vorläufermoleküle, oft Metallsalze, mit Hilfe eines Fällungsreagenzes zum gewünschten Produkt ausgefällt. So können Metall-, als auch Metalloxidnanopartikel hergestellt werden. Dieser Prozess dient oftmals nur als Vorstufe zur Darstellung von Nanopartikeln, nach dem anschließend noch weitere Heizschritte folgen, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Solche Heizschritte können wiederum wie in Kapitel 2.2.2 beschriebene Autoklavenreaktionen sein<sup>[30]</sup> oder einfache Temperschritte in denen das Produkt getrocknet wird<sup>[33], [34]</sup> oder weitere Oxidation stattfindet. Der entscheidende Faktor zur Kontrolle der Morphologie und der Größe der

Partikel ist hier die Reaktionskinetik. Diese kann hauptsächlich durch die Reaktionstemperatur, den pH-Wert und die Wahl des Lösungsmittels beeinflusst werden, aber auch die Konzentration aller Komponenten und die Reihenfolge der Zugabe können eine große Rolle spielen. In Abbildung 4 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von  $\text{MnO}_2$ -Partikeln gezeigt, welche über eine klassische Fällung aus Kaliumpermanganat als Vorläufermolekül und Polyallylaminhydrochlorid als Fällungsreagenz und Ligand hergestellt wurden. [35]

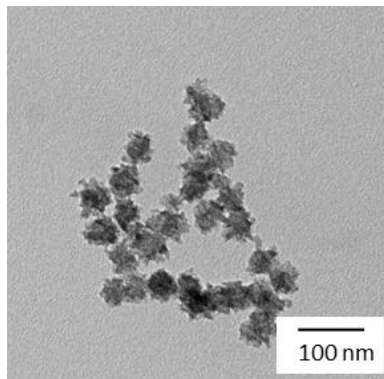


Abbildung 4: TEM-Aufnahme von  $\text{MnO}_2$ -Nanopartikeln aus einer Fällungsreaktion. (Eigene Ergebnisse)

Die Sol-Gel-Synthese zur Darstellung von Nanopartikeln ist ebenfalls eine Fällungsreaktion, deren einzelne Reaktionsschritte genau definiert sind. Dieser Prozess dient der Herstellung von nichtmetallischen anorganischen Materialien aus kolloidalen Dispersionen. [36] Im klassischen Sol-Gel-Prozess wird der Präkursor, meist ein Alkoholat, zunächst gelöst, so dass ein Sol, also eine kolloidale Dispersion erhalten wird. Danach wird das Sol durch abdampfen des Lösungsmittels geliert, was zu einer Ausbildung eines Netzwerkes aus Solpartikeln führt. Das so erhaltene Gelgerüst kann dann durch Trocknungs- oder Sinterprozesse weiter zum gewünschten Produkt umgesetzt werden. Um tatsächlich einzelne Nanopartikel, im klassischen Sinne zu erhalten, wird die Reaktion nach der Solbildung beendet, es wird also nicht geliert. Genauer gesagt findet anstelle der Gelierung, also der Netzwerkbildung ein Wachstum der Solpartikel statt, so dass Partikel im Bereich von wenigen bis hunderten Nanometern erhalten werden können. In Kapitel 3.2.1 soll genauer auf diesen Prozess im Zusammenhang mit der Darstellung von Siliziumdioxidnanopartikeln eingegangen werden.

Mit Hilfe von diesem Herstellungsverfahren kann noch eine weitere Steuerung der Struktur von solchen Nanopartikeln ermöglicht werden. Hier kommt die templatvermittelte Synthese zum Einsatz, bei der die sogenannten Template („Platzhalter“), oftmals Tenside, zu der Reaktion hinzugegeben werden und so das Wachstum des eigentlichen Vorläufermoleküls beeinflussen. Das wohl bekannteste Beispiel ist hier die Darstellung von mesoporösen Silicananopartikeln, <sup>[37], [38], [39]</sup> deren Porenstruktur über Tenside wie Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Cetyltrimethylammoniumbromid) erhalten werden können. CTAB dient hier als Platzhalter, um den das Siliziumdioxid herum wächst und die Mesoporen entstehen. Auf den Mechanismus dieser Synthese wird genauer in Kapitel 3.2.1 eingegangen.

## **2.3 Krebsimmuntherapie**

Um auf die Krebsimmuntherapie eingehen zu können muss zunächst geklärt werden worum es sich dabei eigentlich handelt. In dem Wort Krebsimmuntherapie steckt zum einen das Wort „Krebs“ und zum anderen das Wort „Immuntherapie“. Was ist Krebs und wie entsteht er? Welche Rolle spielt dabei das Immunsystem und wie funktioniert die Immunabwehr?

### **2.3.1 Immunsystem**

Das Immunsystem, welches aus verschiedenen Organen und Zelltypen besteht, ist das Abwehrsystem des Körpers, welches vor Krankheitserregern schützt und eigene fehlerhafte Zellen entfernt. Dabei besitzen wir von Geburt an die sogenannte angeborene (innate) Immunität, zu der als sehr wichtiger Teil die sogenannten Makrophagen (phagozytische Zellen) gehören, die in der Lage sind verschiedene Pathogene sofort anzugreifen und zu fressen ohne ihnen vorher schon einmal begegnet zu sein. Aber auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Granulocyten (Teil der weißen Blutkörperchen) spielen eine wichtige Rolle beim direkten Angriff von Krankheitserregern. Typische Pathogene sind Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Neben der angeborenen Immunität gibt es noch die

adaptive (erworbene) Immunität, die wir im Laufe unseres Lebens durch Anpassung an Krankheitserreger entwickeln. Hierbei sind die betroffenen Zellen des Immunsystems in der Lage spezifische Angreifer zu erkennen und gezielte Abwehrmechanismen gegen diese zu bilden. Solch eine erworbene Immunantwort, die durch eine Infektion oder eine Impfung erhalten wurde, hält oft ein Leben lang. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die antigen-präsentierenden dendritischen Zellen und die Lymphozyten. Zusammen bilden beide Systeme (angeborene und adaptive Immunität) ein sehr wirksames Immunabwehrsystem, welches den Ausbruch der meisten Krankheiten verhindern kann. Eine weitere wichtige Zelle unseres Immunsystems ist die Mastzelle, die hauptsächlich bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielt aber wohl auch unsere Schleimhäute vor Krankheitserregern schützt.

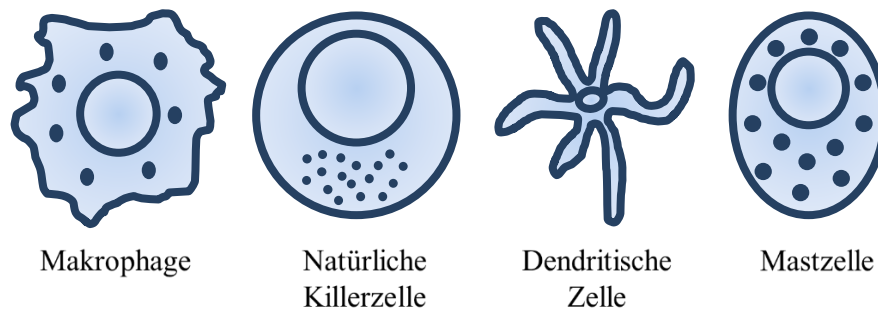


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Zelltypen des Immunsystems. Die innere Linie stellt den Zellkern dar, die äußere Linie die Zellmembran und die Punkte die Granula.

Auf einige der wichtigen Zelltypen, die für unsere gute Immunabwehr verantwortlich sind, wie zum Beispiel die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die Mastzellen aus Abbildung 5 und deren spezifischeren Rollen in unserem Immunsystem wird näher in Kapitel 5 eingegangen.<sup>[40]</sup>

### 2.3.2 Krebs

Es wurde bereits kurz erwähnt, dass unser Immunsystem nicht nur auf fremde Mikroorganismen und Krankheitserreger reagieren kann, sondern auch auf fehlerhaft entwickelte körpereigene Zellen. In einem gesunden Gewebe liegt ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation (Wachstum und Differenzierung) und dem programmierten Zelltod (Apoptose) vor. Durch eine Fehlfunktion der Zellen kann es passieren, dass diese nicht in die Apoptose gehen und so das Gleichgewicht auf die Seite der Proliferation verschoben wird.

Der Grund warum die Zelle krankhaft wird, kann ein Gendefekt eines Wächtergens sein, eines sogenannten Tumorsuppressorgens. Normalerweise erkennen Tumorsuppressoren, wenn eine Zelle einen Defekt hat und reparieren diesen oder leiten die Apoptose ein, wenn dieser Defekt irreparabel oder die Zelle zu alt ist. Wenn das Gen eines solchen Proteins allerdings selbst einen Fehler hat, kann es seine Aufgaben nicht mehr korrekt ausführen. Handelt es sich dabei zusätzlich um ein Apoptose-Gen, wie zum Beispiel das für p53 kodierende Gen, was in über 50% der Fälle einer Krebserkrankung betroffen ist, wird diese Zelle sozusagen unsterblich. Diese Mutation am Genort führt also dazu, dass die betroffene maligne Zelle sich immer weiter teilt und nie in die Apoptose geht, dabei gibt sie ihre Mutation weiter und es beginnt ein unkontrolliertes Wachstum von malignem Gewebe.

Schafft das Immunsystem es an dieser Stelle nicht, diese Zellen zu vernichten, wozu es in diesem Falle nur bedingt in der Lage ist, wachsen diese immer weiter. Diese krankhafte und unkontrollierte Wucherung von Zellen wird als Krebs bezeichnet. Der Grund, warum diese Erkennung für das Immunsystem so schwer ist, ist dass die malignen („krankhaften“) Zellen in vielerlei Hinsicht immer noch den gesunden Zellen gleichen und daher oft zu spät erkannt werden. Zusätzlich entwickelt der Tumor mit weiterem Wachstum und weiteren Mutationen bessere Eigenschaften zum Überleben („*Immune-Escape-Mechanismen*“), zum Beispiel kann er eine eigene Blutversorgung aufbauen oder „lernt“ unter Sauerstoffmangel zu leben. Das größte Problem an solch einem Tumor ist, dass er immer weiter wächst und so gesundes Gewebe verdrängt und zerstört, zusätzlich können die Krebszellen über das Blutkreislaufsystem in den ganzen Körper gelangen und sich überall ansiedeln. Diese Metastasierung ist nur sehr schwer zu bekämpfen.



---

In der Medizin gibt es mittlerweile verschiedene Wege um gegen Krebserkrankungen vorzugehen, dabei spielen die chirurgische Entfernung von Tumoren, die Chemotherapie und die Strahlentherapie die größten Rollen.

Bei der Resektion eines Tumors kann es sein, dass dieser nicht ganz entfernt werden kann, also Teile des Tumors im Körper bleiben, gerade bei einer starken Metastasierung ist dies möglich. Zusätzlich zu diesem operativen Eingriff muss also auch eine Chemotherapie oder Bestrahlung erfolgen, was allerdings eine sehr große Belastung für den Körper darstellt. Aus diesem Grund soll eine lokale Therapie ermöglicht werden, in der entweder der Tumor direkt angesteuert werden kann und vor Ort therapiert oder unser Immunsystem bei der Bekämpfung des malignen Gewebes unterstützt wird.

Dazu muss zunächst geklärt werden, wie überhaupt in dieses System eingegriffen werden kann und wie eine Ansteuerung von Zellen überhaupt funktioniert, um diesen etwas zu vermitteln.

### **2.3.3 Ansteuerung von Zellen mit Hilfe von Nanopartikeln**

Alle Zellen besitzen sogenannte Rezeptoren, Proteine, die Signalmoleküle binden können und dadurch eine Signalkaskade in der Zelle auslösen. Diese Rezeptoren befinden sich entweder im Zellinneren oder ragen aus deren Oberflächenmembran heraus bzw. hindurch und können so Signale von außen empfangen. Die Rezeptoren haben vielerlei Aufgaben, so dienen sie der Zelladhäsion, der allgemeinen Signaltransduktion oder dazu um Substanzen von außen ins Zellinnere zu überführen. Ein sehr interessantes Beispiel ist der CD47-Rezeptor, den alle Zellen tragen und der nichts weniger übermittelt als: „friss mich nicht“. Diese Information ist wichtig für die Makrophagen, unsere Fresszellen, die dafür verantwortlich sind Fremdkörper zu eliminieren. Durch das Signal des vorhandenen CD47-Rezeptors fressen sie die körpereigenen gesunden Zellen nicht auf. Malignes Gewebe hat im Gegensatz dazu ein Protein (Calreticulin) auf der Oberfläche exprimiert, welches ein „friss mich“-Signal weiter gibt. Allerdings „lernen“ diese Zellen schnell (Mutation), ebenfalls das CD47-Protein zu exprimieren, so dass sie vor den Makrophagen geschützt sind und weiter wachsen können.<sup>[41]</sup> Diese Mutation kann als „zelluläre Evolution“ betrachtet werden, bei der die malignen Zellen

überleben, die den „Fehler“ besitzen CD47 zu bilden und so scheinbar für sie überlebensfördernde Mechanismen auszubilden.

Durch das Vorhandensein dieser und anderer spezifischer Rezeptoren ist es möglich mit passenden Zielstrukturen Rezeptoren anzusteuern und so eine bestimmte oder mehrere Signalkaskaden auszulösen. Zu dieser Ansteuerung werden in der Forschung schon seit einigen Jahren Nanopartikel verwendet, die auf der Oberfläche mit solchen Zielvektoren ausgestattet werden (aktive Zellansteuerung). Da nicht alle Zellen dieselben Rezeptoren auf der Oberfläche tragen und diese auch nicht zu gleichen Anteilen, können mit verschiedenen Vektoren auch verschiedene Zelltypen angesteuert werden. Eine rezeptorvermittelte Ansteuerung und Aufnahme ist daher auch nicht immer so leicht. Es gibt auch Wege ohne eine gezielte Ansteuerung, hier tragen die Nanopartikel also keinen Zielvektor auf ihrer Oberfläche (passive Zellansteuerung). In beiden Fällen können die Partikel noch mit einem Wirkstoff, oder einer „Information“ ausgestattet werden. Der Wirkstoff kann dann direkt vor Ort freigesetzt werden und wirken, zum Beispiel bei der direkten Ansteuerung von Krebszellen oder Entzündungszellen und einer Ausstattung mit einem Chemotherapeutikum oder Anti-phlogistikum. Die „Information“ kann ein Baustein sein, der zum Beispiel verschiedenen Zellen unseres Immunsystems „beibringen“ kann malignes Gewebe zu erkennen.

Des Weiteren können die Nanopartikel so ausgestattet sein, dass sie auch für die Bildgebung eine große Hilfe sein können. Sie können mit Farbstoffen oder Liganden funktionalisiert sein, die sie in unterschiedlichen Methoden, wie in der Positronen-Emissions-Tomographie sichtbar machen.<sup>[42], [43], [44]</sup> Der Nanopartikelkern selbst, kann aber auch aus einem Material bestehen, dessen physikalische Eigenschaften dazu geeignet sind, dass die Partikel als Kontrastmittel eingesetzt werden können. Hier wäre zum Beispiel das magnetische Eisenoxid zu nennen, welches in der Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz kommen kann<sup>[45]</sup> oder das röntgenstrahlabschwächende Platin, welches in der Computertomographie (CT) ausgenutzt werden kann.<sup>[12], [13]</sup>

Diese Kombination eines Systems aus Diagnose, besserer Bildgebung und somit Erkennung des Tumors und dessen Therapie, die lokale Wirkstofffreigabe zur Behandlung, wird als *Theranostik* bezeichnet.<sup>[46]</sup>

### 2.3.3.1 Passive Zellansteuerung

Bei der passiven Zellansteuerung besitzen die Nanopartikel keinen spezifischen Vektor auf der Oberfläche um an bestimmte Zelltypen binden zu können. Allerdings kann aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten im Vergleich zum Blut (bei einer intravenösen (iv) Verabreichung) eine Anreicherung von Partikeln im Gewebe stattfinden. Diese Anreicherung ist natürlich nicht spezifisch und kann im ganzen Körper gleichermaßen erfolgen. Tumorgewebe besitzt allerdings eine höhere Dichte an Blutgefäßen, eine erhöhte Permeabilität der extrazellulären Matrix und eine höhere Durchflussgeschwindigkeit aufgrund des höheren Energiebedarfs. Dadurch ist die Anreicherung von Makromolekülen und auch Nanopartikeln in diesem Gewebe erhöht. Dieser Effekt, der sogenannte EPR-Effekt (engl.: *enhanced permeability and retention*) ist ein wichtiger Bestandteil der passiven Zellansteuerung. Über diesen Weg können zwar keine spezifischen Gewebe kontrolliert angesteuert werden, allerdings kann eine ausreichende Anreicherung der Nanopartikel im Tumor, über den EPR-Effekt erfolgen.

Ein weiteres Beispiel der passiven Zellansteuerung ist die Bildung einer sogenannten Proteinkorona. Hierbei handelt es sich um eine Ablagerung von Serumproteinen aus dem Blut auf die Nanopartikeloberfläche. <sup>[47]</sup> Diese Korona kann dazu führen, dass die erhöhte Anreicherung im Tumorgewebe nicht mehr gegeben ist, <sup>[17]</sup> da bestimmte Serumproteine eine Verschiebung der Partikel in bestimmte Zellkompartimente verursachen würden.

Zusätzlich kann es zu einer Erkennung der Nanopartikel durch das retikulohistiozytäre System (RHS-System) kommen, was zu einer Entfernung dieser führen würde. Die RHS-Zellen, verschiedene Zellen, die in das retikuläre Bindegewebe eingewandert sind und hier als Makrophagen umherwandern, sind Teil des Immunsystems und dienen zur Abwehr und Beseitigung von Fremdstoffen. <sup>[48]</sup> Die Nanopartikel sollten also getarnt sein, damit sie lange genug im Blutkreislauf zirkulieren können um sich ausreichend im Tumorgewebe anreichern zu können. Es darf sich also keine zu große Proteinkorona um die Partikel bilden, die zur leichteren Erkennung der Nanopartikel für das RHS-System führt. Dieser Schutz, diese Tarnung der Partikel wird als Stealth-Effekt bezeichnet und ist gerade im Falle der passiven Zellansteuerung sehr wichtig.

### **2.3.3.2 Aktive Zellansteuerung**

Die aktive Zellansteuerung lässt sich im Vergleich zur passiven viel leichter von außen beeinflussen. Gerade malignes Gewebe hat oft bestimmte Oberflächenrezeptoren auf nicht natürliche Weise überexprimiert, das heißt sie tragen diese Rezeptoren viel häufiger als gesundes Gewebe. Ein hierfür bekannter Rezeptor ist zum Beispiel der EGF-Rezeptor (engl.: *epidermal growth factor receptor*). Die Nanopartikel können also mit passenden Zielvektoren, wie kleineren Proteinen, DNA/RNA-Fragmenten oder Antikörpern nach dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip gekoppelt werden.<sup>[49]</sup> Durch die spezifische Bindung über diese Strukturen ist eine erhöhte Aufnahme der Partikel in die Zelle wahrscheinlich, da im Vergleich zur unspezifischen Bindung eine rezeptorvermittelte Signalkaskade ausgelöst wird.

Für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise der später eingesetzten Nanopartikel wird die aktive Zellansteuerung, in dieser Arbeit, nochmals in eine direkte und indirekte Ansteuerung von malignem Gewebe unterteilt.

#### **Direkte Ansteuerung von Krebszellen**

Bei der direkten Ansteuerung von malignem Gewebe werden die Nanopartikel mit einem Zielvektor ausgestattet, der direkt an einen vom Tumor exprimierten Rezeptor binden kann (siehe Abbildung 6). Die lokale Bindung der Partikel an den Tumor kann dann zur Kontrastierung in der Bildgebung ausgenutzt werden und es kann vor Ort ein Wirkstoff abgegeben werden, der die krankhaften Zellen schädigt, so dass keine erhöhte Belastung für gesundes Gewebe besteht. Ob die Nanopartikel an der Zellmembran haften bleiben oder von der Zelle aufgenommen werden wird nicht weiter unterschieden.

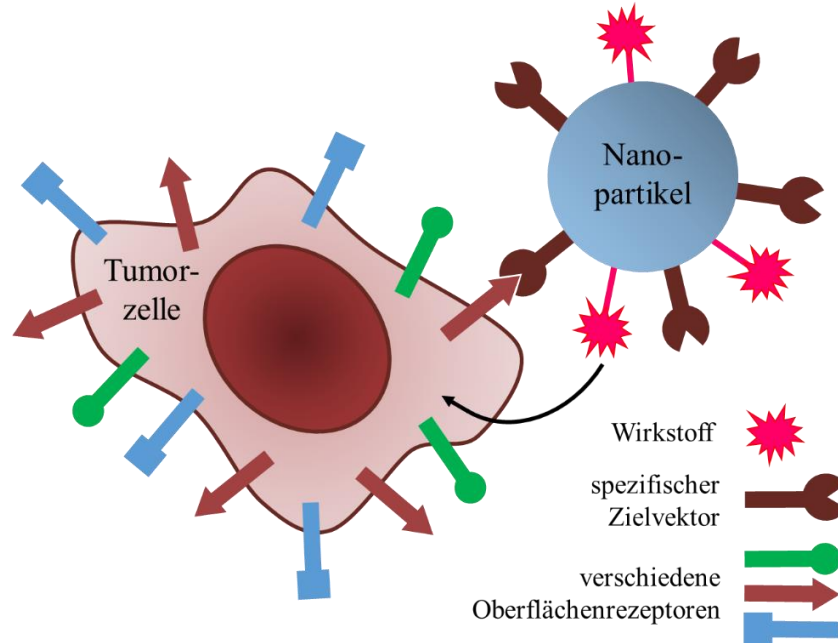


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer direkten Krebszellenadressierung durch Nanopartikel.

### **Indirekte Ansteuerung von Krebszellen über Zellen des Immunsystems**

Bei der indirekten Ansteuerung ist in dieser Arbeit die Ansteuerung von Immunsystemzellen gemeint, welchen so bei der Erkennung und Bekämpfung des malignen Gewebes geholfen werden soll. Die Nanopartikel werden dabei also nicht mit einem Wirkstoff gegen den Tumor ausgestattet, sondern mit einer „Information“ die zur Erkennung des selbigen beitragen soll. Solch eine beispielhafte Signalkaskade ist schematisch in Abbildung 7 zu sehen.

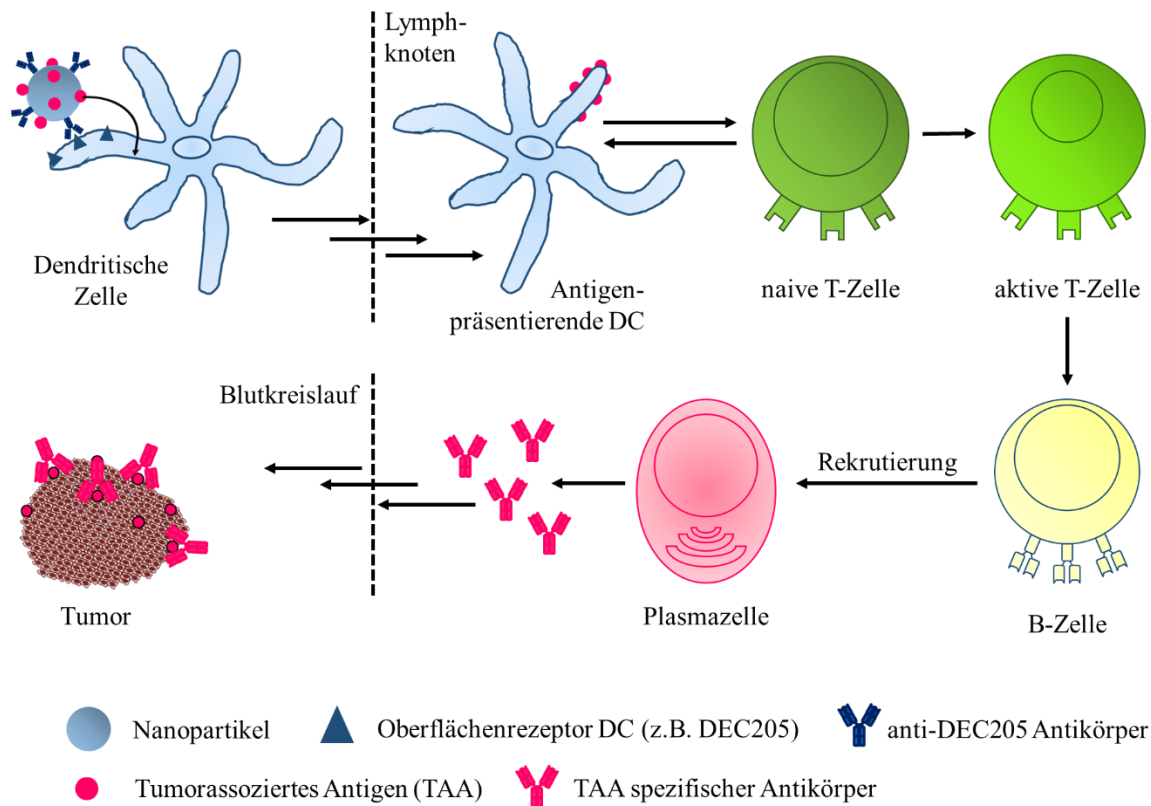


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer möglichen indirekten Ansteuerung von Krebszellen mit Nanopartikeln. Eine Ansteuerung von B-Zellen kommt zum Beispiel bei CD4-T<sub>H</sub>2-Zellen vor. Andere T-Zellen würden sich an dieser Stelle zum Beispiel zu T-Effektorzellen entwickeln, die wiederum verschiedene Funktionen besitzen können.

Hierbei werden die Nanopartikel mit einem Zielvektor, der eine antigenpräsentierende Zelle wie eine Makrophage oder dendritische Zelle ansteuern kann und einem tumorassoziierten Antigen funktionalisiert. Die Partikel binden also an die dendritische Zelle, diese wird aktiviert und das Antigen wird aufgenommen. Diese Zelle ist nun in der Lage das Antigen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, in das Lymphsystem einzuwandern und dort eine naive T-Zelle zu aktivieren. Zwischen der DC und der T-Zelle erfolgt eine Reihe von Signalkaskaden, die hier nicht weiter erläutert werden sollen, bis die aktivierte T-Zelle alle benötigten Informationen bekommen hat und sie z.B. an eine B-Zelle weiter geben kann. Diese sind ihrerseits dazu in der Lage zu Plasmazellen zu differenzieren, welche dann spezifische Antikörper gegen das tumorassoziierte Antigen produzieren können. Die Antikörper gelangen dann über das

Blutkreislaufsystem zu dem Tumor und können an diesen binden, da sie spezifisch auf seine Antigene passen. Die gebundenen Antigene dienen als Erkennungsstruktur, wodurch das Immunsystem das maligne Gewebe erkennen und bekämpfen kann.





# Kapitel 3

## Herstellung der Nanopartikel

### 3.1 Metall- und Metalloxidnanopartikel

#### 3.1.1 Einführung und Theorie

##### 3.1.1.1 Isotrope Nanopartikel

Für die spätere Kombination von Metall- und Metalloxidnanopartikeln mit  $\text{SiO}_2$  müssen diese zunächst synthetisiert werden, da sie für alle Zielstrukturen als „Keime“ vorgelegt werden, um die gewollte Partikelstruktur zu erhalten. Alle im Folgenden vorgestellten Partikelarten werden über eine thermische Zersetzung (siehe Kapitel 2) von spezifischen Vorläufermolekülen gewonnen. Durch die Variation diverser Reaktionsparameter kann Einfluss auf die Morphologie der Partikel genommen werden. Es können z.B. Sphären, Nadeln aber auch Heterostrukturen erhalten werden.

Als erstes soll hier die Synthese von sphärischen Manganoxidnanopartikeln vorgestellt werden, deren Größe und Morphologie hauptsächlich über die Art des Vorläufermoleküls und ein angepasstes Temperaturprofil bestimmt werden kann.<sup>[28]</sup> Danach wird die Heißinjektionsmethode der thermischen Zersetzung zur Darstellung von Platinnanopartikeln beschrieben, bei der zur besseren Formkontrolle der Partikel Eisenpentacarbonyl als Keimbildner zum Einsatz kommt.

### 3.1.1.2 Heterodimerpartikel

Als Heterodimerpartikel werden in dieser Arbeit Nanopartikel bezeichnet, die aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammengesetzt sind, in der Literatur wird hier auch oft von *dumbbell-like*, *snowman-like* oder Janus-Partikeln gesprochen<sup>[50] [51], [52]</sup> (Janus: römischer Gott mit zwei Gesichtern). Als Janus-Partikel werden hauptsächlich sphärische Partikel bezeichnet (siehe Abbildung 8 A), die sich aus zwei verschiedenen Materialien zusammensetzen.<sup>[50]</sup> Die hier hergestellten Partikel besitzen jedoch eine anisotrope Struktur, wovon eine Domäne meist größer ist als die andere. ihre Eigenschaften setzen sich somit aus denen beider Materialien zusammen.<sup>[53], [54]</sup>

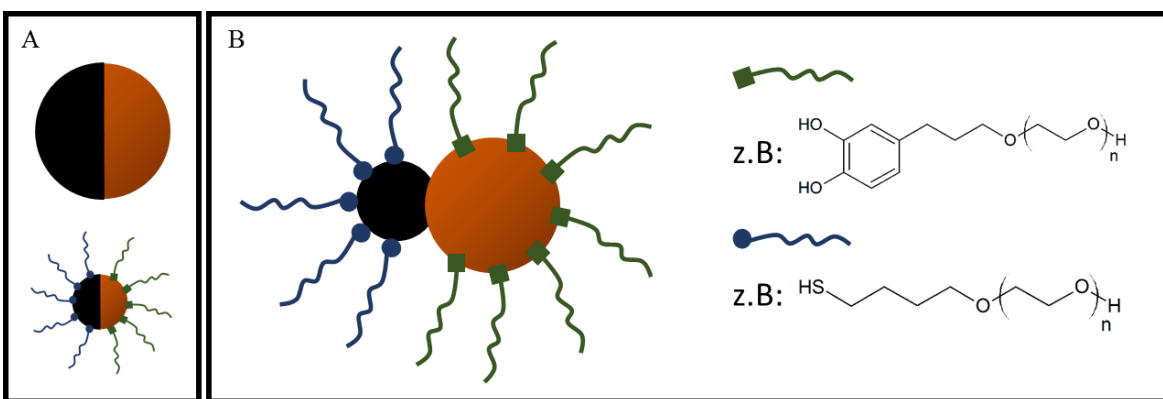


Abbildung 8: Schematische Darstellung A: eines sphärischen Janus-Partikels und B: einer orthogonalen Funktionalisierung eines Heterodimers mit zwei PEG-Liganden, welche verschiedene Ankergruppen tragen.

Im Gegensatz zu den isotropen Partikeln stehen hier für spätere Anwendungen zwei Kernmaterialien zur Verfügung, die gleichzeitig auch unterschiedliche Oberflächen besitzen. Diese differenzierenden Oberflächen bieten Raum für die Anbindung ungleichartiger Liganden bzw. deren Ankergruppen und dienen somit einer erhöhten Funktionalisierbarkeit (siehe Abbildung 8 B). Diese beidseitige Funktionalisierung wird als orthogonale Funktionalisierung bezeichnet. Hierbei können also leicht mehrere Substanzen, wie Farbstoffe oder Wirkstoffe, getrennt voneinander auf die Partikeloberfläche gebracht werden.

In dieser Arbeit soll die Synthese von Pt@MnO-Heterodimerpartikeln vorgestellt werden, wobei die in Kapitel 3.1.2.2 hergestellten isotropen Platinpartikel als Keime für die Bildung der beschriebenen Struktur dienen. Dazu werden die Pt-Partikel zusammen mit dem Vorläufermolekül (Mn(II)-Oleat) für die Manganoxiddomäne vorgelegt. Sind die entsprechenden Reaktionsparameter, wie Menge und Art der Schutzliganden, Reaktionstemperatur und Lösungsmittel nicht richtig gewählt, können neben den gewünschten Heterodimerpartikeln separate Sphären oder andere Heterostrukturen, wie Trimere oder Blumen<sup>[55]</sup> entstehen.

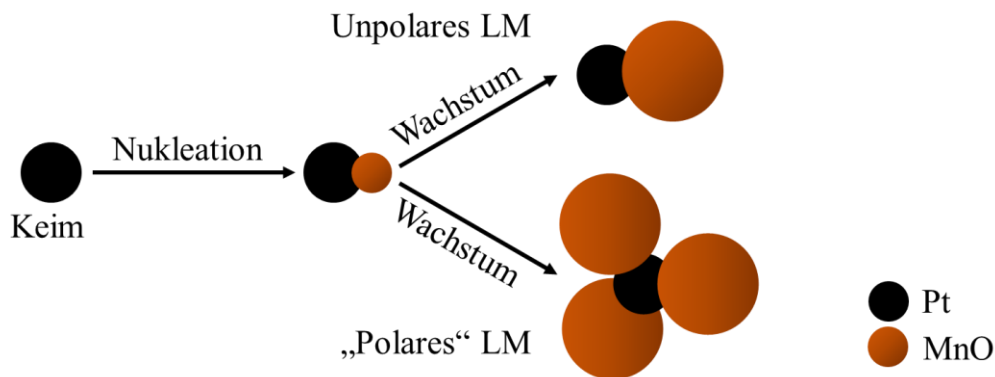


Abbildung 9: Mögliches Schema zum Wachstum von Heterodimeren.<sup>[56]</sup>

Zu wenig Schutzliganden in der Reaktionslösung schirmen die Keimpartikel unzureichend ab, sodass mehrere Domänen auf einem Keim wachsen. Zusätzlich spielt das Lösungsmittel eine große Rolle (Abbildung 9). Hierbei haben besonders unterschiedliche Polaritäten der verschiedenen Lösungsmittel einen Einfluss auf das Partikelwachstum. Nukleiert zum

Beispiel Manganoxid an einer Stelle eines Platinpartikels, wird dem Platinpartikel Elektronendichte entzogen, die für diese Nukleation benötigt wird. Findet die Reaktion in einem eher polaren organischen Lösungsmittel, wie Benzylether statt, kann dieses dem Platin Elektronendichte (durch  $\pi$ -Elektronendichte) zur Verfügung stellen und es können an anderen Stellen des Partikels weitere Domänen aufwachsen. Wird im Vergleich dazu ein sehr unpolares Lösungsmittel, wie Hexadecan, verwendet, kann dieses den Elektronenmangel nicht ausgleichen und ein Wachstum von weiteren Domänen auf dem Platinpartikel wird erschwert. So können kontrolliert Heterodimerpartikel mit einer einzigen Domäne hergestellt werden.

### 3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1.2.1 Manganoxidnanopartikel

Sphärische MnO-Partikel wurden ausgehend von Mangan(II)-Oleat als Vorläufermolekül nach der Synthese von Schladt *et al.* [28] synthetisiert. Mit einer Heizrate von 2°C/min und einer Reaktionstemperatur von 320°C konnten monodisperse 15 nm große MnO-Nanopartikel erhalten werden, deren elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abbildung 10 dargestellt sind. Durch die Zersetzung des Vorläufermoleküls wird in der Reaktion Ölsäure frei, welche den Partikeln als Schutzligand dient. Durch diesen Liganden sind die Nanopartikel sehr gut in unpolaren Lösungsmitteln löslich.

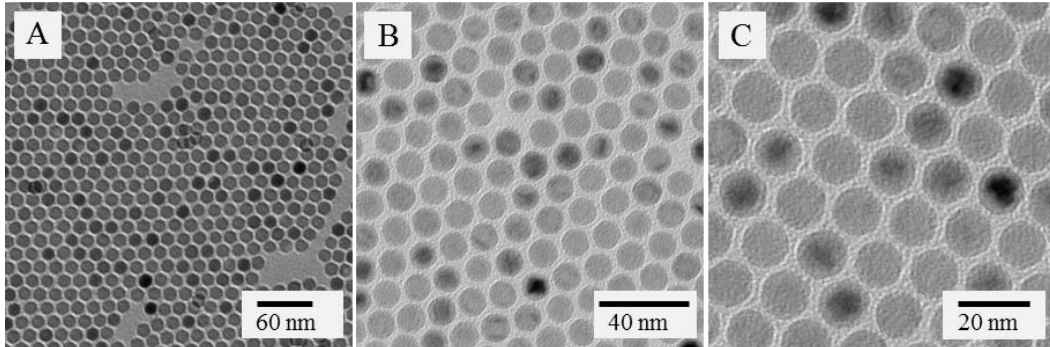
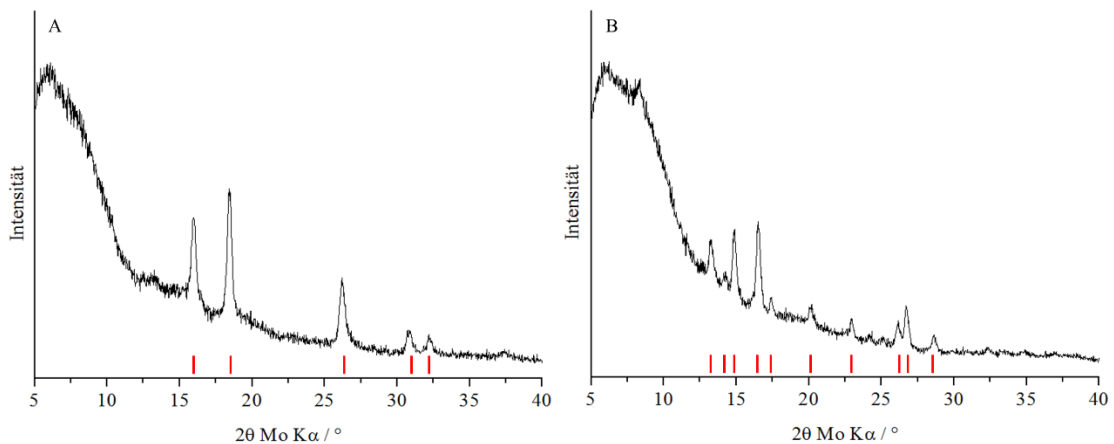


Abbildung 10: TEM-Aufnahmen von MnO-Nanopartikeln.

Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie (Abbildung 11 A) konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesen Nanopartikeln um MnO-Partikel und nicht um höher oxidierte Formen handelt.

Abbildung 11: Pulverröntgendiffraktogramm von A: MnO- (Manganosit) und B: Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln (Hausmannit).

Um höher oxidierte Formen des Manganoxides zu erhalten, wurden MnO-Nanopartikel nach ihrer Aufarbeitung mit dem Oxidationsmittel Trimethylamin-N-Oxid (Me<sub>3</sub>NO) umgesetzt. Hierzu wurden die Partikel in einem Massenverhältnis von 1:1 mit dem Oxidationsmittel in Octadecen erhitzt und erneut aufgereinigt. Eine röntgendiffraktometrische Messung (Abbildung 11 B) der Partikel konnte bestätigen, dass die MnO-Partikel zu Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> oxidiert werden konnten. Zum Teil wurde auch eine Mischphase aus MnO und Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> erhalten. Dieser Oxidationsprozess zerstört jedoch einen Großteil der stabilisierenden Ölsäure, was dazu führt,

dass die Nanopartikel nicht mehr so gut löslich sind wie die Ursprungspartikel. Eine Verbesserung der Löslichkeit konnte erzielt werden, in dem die Partikel nach der Oxidation nochmal mit Ölsäure zusammen bei niedrigeren Temperaturen erhitzt wurden. Jedoch konnte auch dieser Prozess die ursprüngliche Löslichkeit nicht wieder herstellen. Während MnO-Partikel über Monate stabil in Lösung bleiben, fallen die Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Partikel, je nach Charge bereits nach Minuten, Tagen oder Wochen aus.

### 3.1.2.2 Pt-Nanopartikel

Die Platinnanopartikel wurden nach der Methode von Wang *et al.* [57] synthetisiert. Ausgehend von Platinacetylacetonat entstanden mit Eisenpentacarbonyl (katalytische Mengen) als Keimbildner und den Schutzliganden Ölsäure und Oleylamin kubische Pt-Partikel. Analog hierzu können unter Zugabe von äquimolaren Mengen Eisenpentacarbonyl auch FePt-Partikel hergestellt werden. [58]

Bei dieser Heißinjektionsmethode der thermischen Zersetzung wurde zunächst das Vorläufermolekül Platinacetylacetonat, zusammen mit den benötigten Schutzliganden vorgelegt und auf 130°C erhitzt. Diese Reaktionstemperatur muss unterhalb der Zersetzungstemperatur des eingesetzten Präkursors liegen, damit noch kein unkontrolliertes Keimwachstum eintreten kann. Als Keimbildner wurde dann schlagartig Eisenpentacarbonyl injiziert. Sobald das Carbonyl in die heiße Lösung des Platinacetylacetonats gelangt, begann die Keimbildung, was auch optisch am Farbumschlag von gelb nach schwarz zu erkennen war. Danach wurde für ein homogenes Wachstum der Partikel noch für 1 h auf 180°C geheizt. In Abbildung 12 sind die TEM-Aufnahmen und das Röntgendiffraktogramm der Platinpartikel gezeigt.

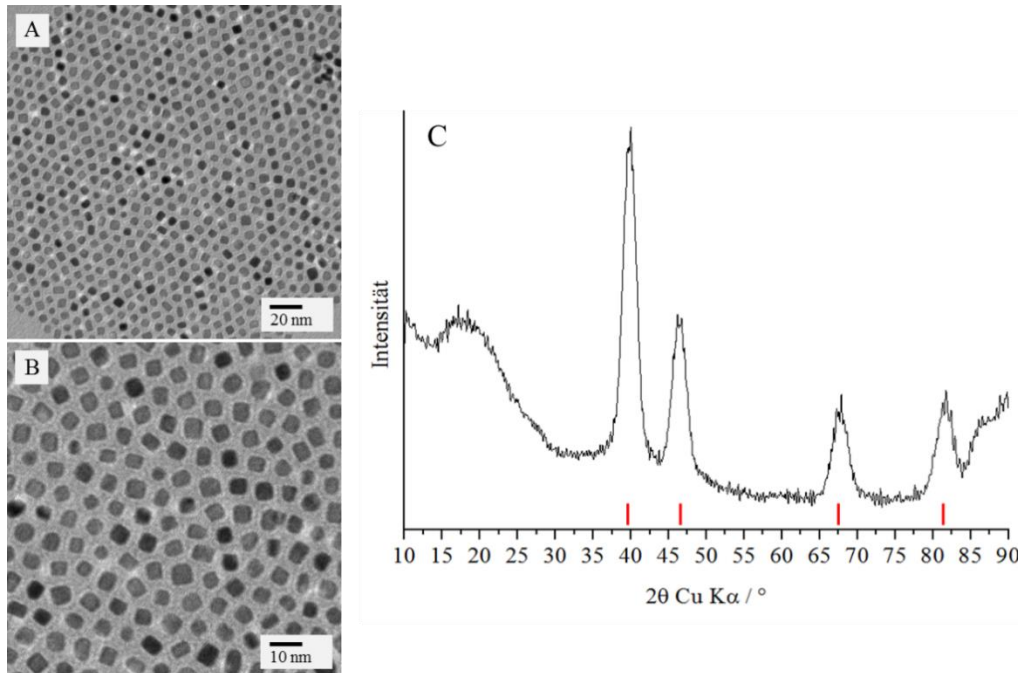


Abbildung 12: A, B: TEM-Aufnahmen und C: Röntgendiffraktogramm von Platinpartikeln.

### 3.1.2.3 Heterodimere

In diesem Kapitel wird die Herstellung von Pt@MnO- bzw. FePt@MnO-Heterodimeren beschrieben. Im Folgenden wird lediglich von Platinpartikeln gesprochen, es ist aber immer Platin oder Eisenplatin gemeint, da für beide Partikel die Heterodimersynthese analog funktioniert. Hierzu wurden die zuvor hergestellten Platinpartikel zusammen mit Mangan(II)-Oleat und den Schutzliganden Ölsäure und Oleylamin in Hexadecan vorgelegt und 1 h auf 290°C erhitzt. Die Synthese konnte so angepasst werden, dass lediglich Pt@MnO-Dimere entstanden und keine Verunreinigungen von anderen Heteropartikeln vorhanden waren. Über die zugegebene Menge des Mangan(II)-Oleats konnte die Manganoxiddomänengröße auf den Platinpartikeln gesteuert werden. Hierzu wurde die Oleatmenge im Bereich von 10-50 mg in 10 mg Schritten variiert. In den TEM-Aufnahmen in Abbildung 13 sind die Heterodimerpartikel mit verschieden großen MnO-Domänen abgebildet.

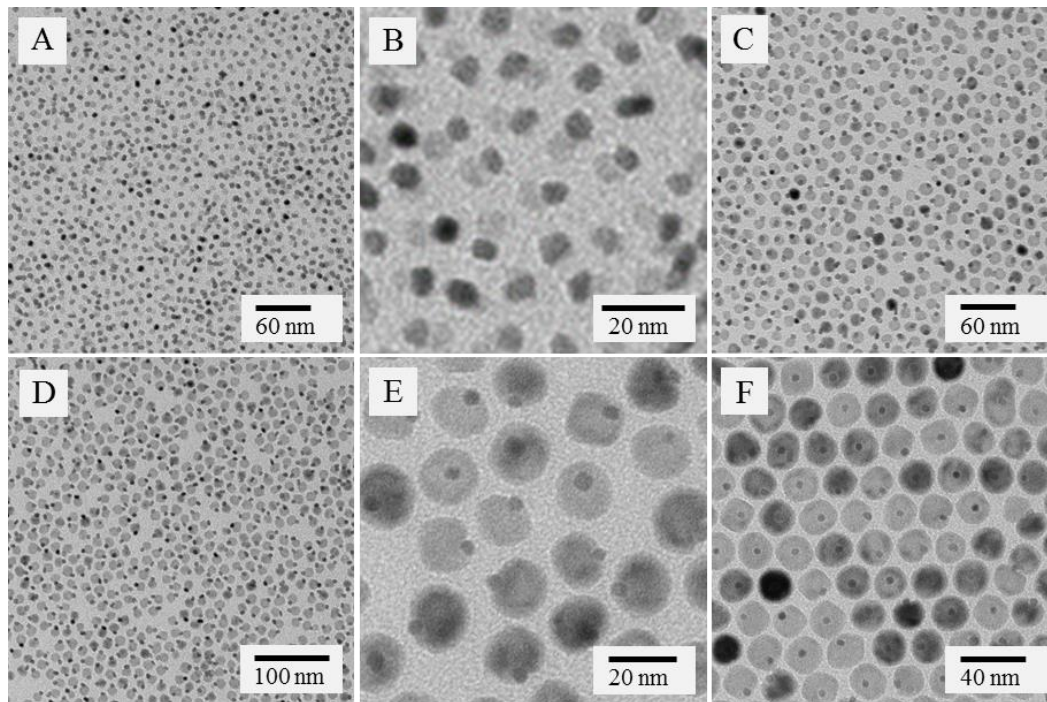


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt@MnO-Heterodimerpartikeln mit unterschiedlich großen Manganoxiddomänen. A, B:  $4\pm 1$  nm (Domänenverhältnis 1:1), C:  $8\pm 1$  nm (1:2), D:  $12\pm 2$  nm (1:3), E:  $16\pm 2$  nm (1:4) und F:  $20\pm 2$  nm (1:5).

Von Abbildung 13 A bis F wird die MnO-Domäne mit zunehmender Menge an Oleat in der Synthese größer. So konnten Dimere in den Verhältnissen 1:1 (A, B) bis 1:5 (F) hergestellt werden. Es konnten dieselben Ergebnisse für FePt@MnO-Heterodimerpartikel erzielt werden (siehe Anhang, E.3).

### 3.1.3 Zusammenfassung

Es wurden erfolgreich monodisperse, sphärische Manganoxidpartikel nach Schladt *et al.* hergestellt, welche zu einer höher oxidierten Form umgesetzt werden konnten. Für die so dargestellten  $\text{Mn}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel muss noch ein Weg gefunden werden um diese wieder besser zu solubilisieren, da dies für eine weitere Anwendung unabdingbar ist. Die MnO- und  $\text{Mn}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel sollen in Zusammenarbeit mit [REDACTED], AK [REDACTED], Universität Mainz, für die Mangan-Superoxiddismutase in Biomimetika eingesetzt werden.



Dabei sollen die besonderen katalytischen Eigenschaften der Partikel, die sie aufgrund ihrer geringen Größe besitzen (erhöhtes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis im Vergleich zum Bulk-Material) ausgenutzt werden. <sup>[59], [60]</sup> Dazu sollen die Partikel sogenannte Superoxid-dismutasen (SOD) imitieren. <sup>[61]</sup> Hierbei handelt es sich um metallhaltige Enzyme im Körper, die mit Hilfe dieser katalytischen Redoxzentren dem Radikalfang dienen. Dabei wandeln sie hauptsächlich vorhandene Superoxid-Anionen, die den Körper sonst schädigen könnten, in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um. <sup>[62], [63]</sup> Wasserstoffperoxid kann dann in der Zelle zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden. Es existieren verschiedene Superoxiddismutasen, dazu gehören unter anderem die mangan- oder eisenhaltigen SOD. Die Manganoxidpartikel sollen genau für diese katalytische Reaktion im Körper eingesetzt werden. Hierbei wird von den  $\text{Mn}_3^{\text{II,III}}\text{O}_4$ -Partikeln, im Vergleich zu den  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{O}$ -Partikeln eine höhere Katalyseaktivität erwartet.

Des Weiteren konnten Pt@MnO- und FePt@MnO-Heterodimerpartikel in verschiedenen Größen hergestellt werden, die zum einen in Kapitel 3.3 nochmal zum Einsatz kommen und zum anderen in Kooperation mit Xiao Sun und Alica Klapper, Forschungszentrum Jülich\* genauer auf ihre physikalischen Eigenschaften untersucht wurden.

Die dazugehörigen Daten sind im Manuskript „Magnetic behavior of monomer MnO and heterodimer FePt@MnO nanoparticles“ im Anhang (E.8) dieser Arbeit aufgeführt.

\*Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Oleg Petravic, Ruhr Universität Bochum, Jülich Centre for Neutron Science JCNS and Peter Grünberg Institut PGI, JARA-FIT, Forschungszentrum Jülich GmbH.

## 3.2 Siliziumdioxidnanopartikel

### 3.2.1 Einführung und Theorie

In den Grundlagen in Kapitel 2 wurde bereits auf die Fällungsreaktion, sowie auf die Sol-Gel-Reaktion eingegangen. Die Herstellung von Silicananopartikeln basiert ebenfalls auf solch einem Prozess und wurde erstmals von Stöber *et al.* [64] publiziert. Ausgehend von einem Siliziumalkoxid, wie Tetraethylorthosilikat (TEOS), können über dessen Hydrolyse und Kondensation  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel in verschiedenen Größen erhalten werden. Dabei ist der erste Schritt dieser Reaktion ebenfalls die Bildung des Sols, allerdings wird dieses nicht geliert, sondern es findet ein Wachstum der Solpartikel zu den Nanopartikeln statt. [65] Hier liegt der entscheidende Unterschied zur klassischen Sol-Gel-Methode. Abbildung 14 zeigt den Verlauf eines klassischen Sol-Gel-Prozesses im Vergleich zum Stöber-Prozess für die Bildung von Silicananopartikel. Hier ist noch einmal gezeigt, dass sich die gebildeten Solpartikel aus dem ersten Schritt im ersten Fall zu einem Netzwerk, dem Gel, zusammen lagern, wohingegen im zweiten Fall die Partikel zu Nanopartikeln anwachsen. [65]

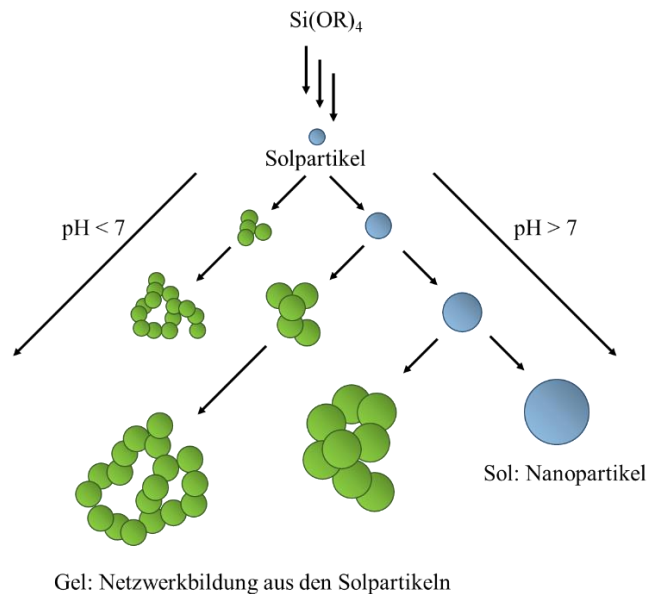


Abbildung 14: Schematische Darstellung des klassischen Sol-Gel-Prozesses im Vergleich zur Silicananopartikelbildung. [65]

Der genaue Reaktionsverlauf ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Reaktion findet in Wasser oder in Alkohol unter Zugabe von geringen Mengen Wasser statt, sodass das Alkoxid-Monomer  $\text{Si}(\text{OR})_4$  zunächst hydrolysiert wird. Danach erfolgt die Polykondensation von einzelnen Alkoxiden zu Dimeren über Trimeren, Tetrameren usw. bis hin zu Partikeln. Die Partikeloberfläche besteht aus Silizium-, Sauerstoffatomen und Hydroxylgruppen, an denen keine weitere Polykondensation von Monomeren stattgefunden hat.

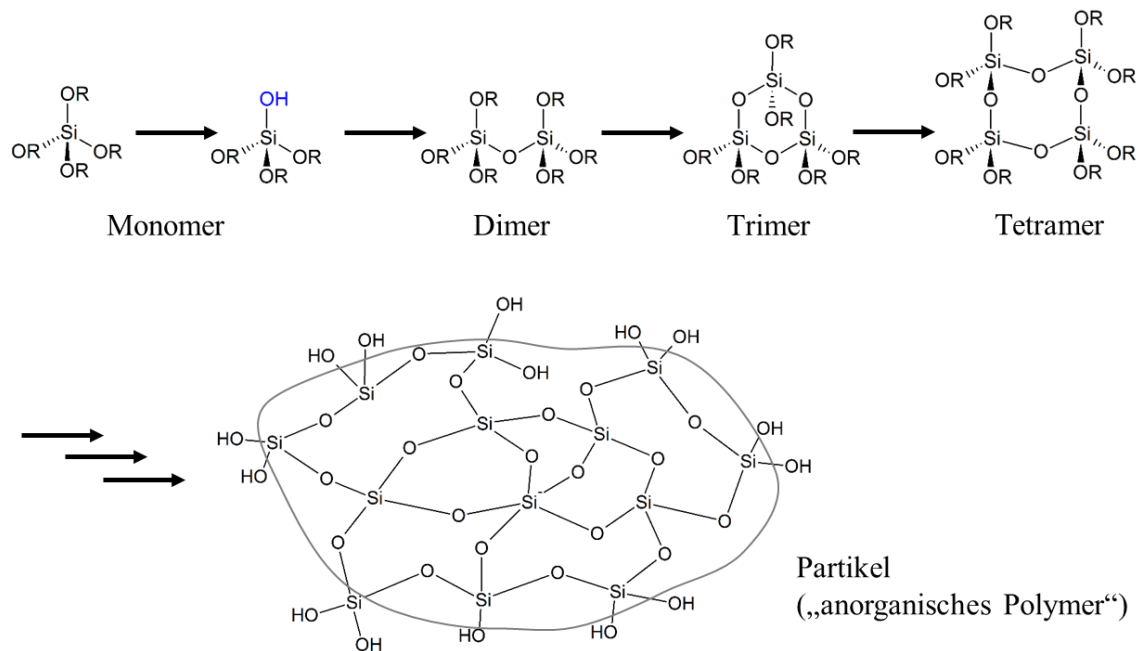


Abbildung 15: Hydrolyse und Polykondensation eines Siliziumalkoxid zu einem  $\text{SiO}_2$ -Partikel. Die fertigen Partikel tragen Hydroxylgruppen, an denen keine weitere Polykondensation stattgefunden hat, auf der Oberfläche.

Ein entscheidendes Kriterium für die Bildung von sphärischen Partikeln ist die basische Katalyse der Reaktion. Zur Reaktionsbeschleunigung der Bildung von  $\text{SiO}_2$  (egal welche Morphologie) ist sowohl eine saure als auch eine basische Katalyse geeignet, allerdings dienen die  $\text{OH}^-$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen nicht nur zur Reaktionsbeschleunigung sondern auch zur Formkontrolle des entstehenden Produkts. In Abbildung 16 sind die Mechanismen beider Katalysewege dargestellt.

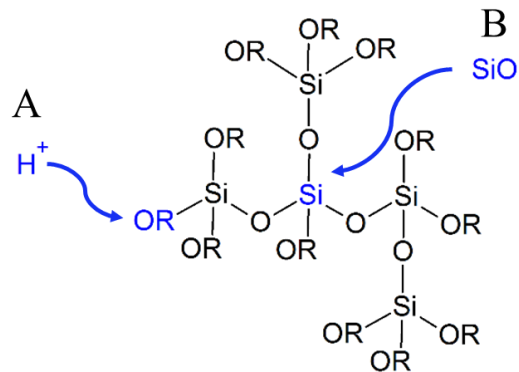


Abbildung 16: Mechanismus der sauren und basischen Katalyse.

In Fall A findet der Angriff der  $H^+$ -Ionen bevorzugt an den Kettenenden statt, sodass zunächst kettenartige Polymere entstehen, die dann zu einem großen Netzwerk heranwachsen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Fall die Hydrolyse. Im zweiten Fall wird die Geschwindigkeit über die Kondensation der Monomere kontrolliert, wobei der Angriff der  $OH^-/SiO^-$ -Ionen bevorzugt an den mittelständigen Si-Atomen stattfindet. Diese ständige Kondensation an eher zentrumsnahen Siliziumatomen führt zu einem sphärischen Wachstum und damit zu einem kompakten Partikel. <sup>[65]</sup> Um somit über diesen Prozess Nanopartikel herstellen zu können, muss die Reaktion basisch katalysiert ablaufen, was mit der Zugabe von Ammoniak oder einer anderen Base gewährleistet wird. Der pH-Wert spielt daher eine große Rolle in der Form- und Größenkontrolle der Partikel, aber auch andere Reaktionsparameter, wie die Temperatur sind hier nicht zu unterschätzen. Die Struktur der gebildeten  $SiO_2$ -Nanopartikel besitzt keine Fernordnung und ist somit amorph (Abbildung 17).

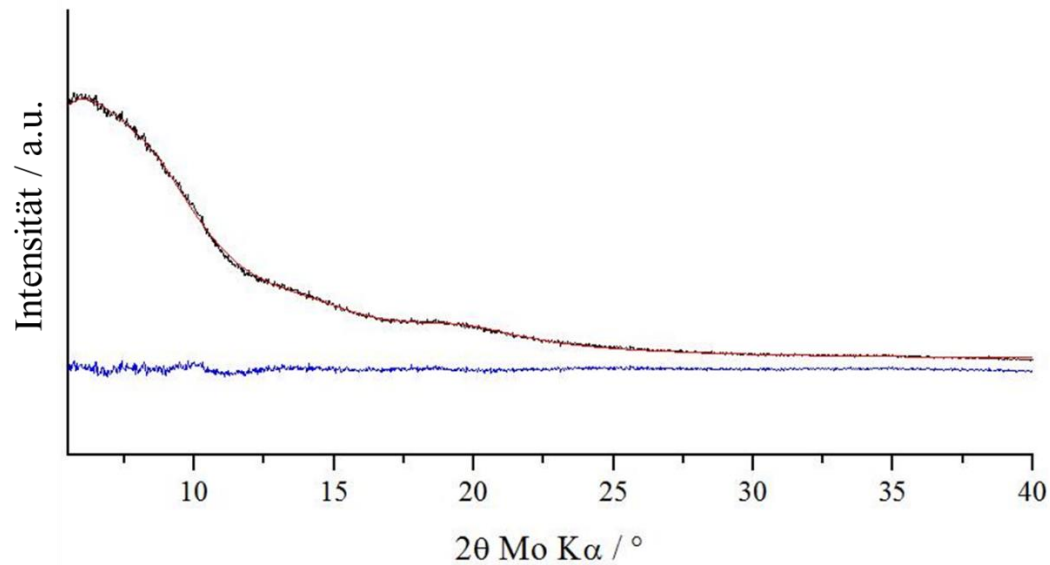


Abbildung 17: Röntgendiffraktogramm von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. Schwarz: Experiment, rot: Anpassung, blau: Differenz. <sup>[66]</sup>

Dieser Weg der Herstellung von Silicananopartikeln kann zur besseren Form- und Größenkontrolle der Partikel noch weiter optimiert werden. Hierzu wurde eine simulierte Mikroreaktorsynthese angewendet. Dabei wird als Reaktionsraum eine reverse Mikroemulsion zur Bildung der Nanopartikel ausgenutzt. <sup>[67]</sup> Die benötigte wässrige Phase befindet sich in Form von kleinsten Mikrotröpfchen, stabilisiert durch ein Tensid wie Igepal<sup>®</sup> CO-520, in einer unpolaren Phase. Diese kleinen Mikrotröpfchen simulieren einen kleinsten Reaktionsraum, ähnlich dem in einer Mikroreaktorsynthese, in der die Reaktion dann in kleinem Maßstab abläuft. Dies hat den Vorteil einer viel besseren Homogenisierung der Reaktionslösung, was zu einem gleichmäßigeren Wachstum führt. Zusätzlich ist der Reaktionsraum so beschränkt, dass die Bildung von großen Partikeln oder Agglomeraten unterdrückt werden kann. Abbildung 18 zeigt schematisch den Reaktionsaufbau der Silica-partikelsynthese über die reverse Mikroemulsion.

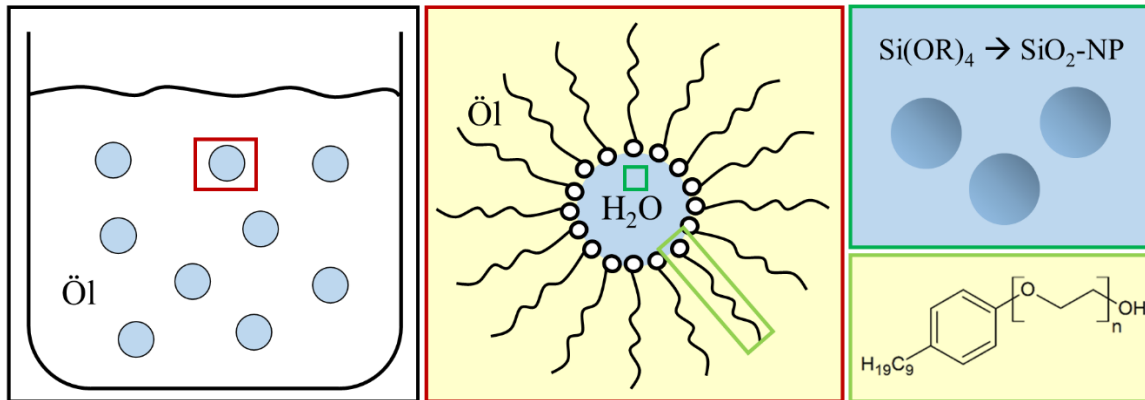


Abbildung 18: Schematische Darstellung der reversen Mikroemulsion und chemische Strukturformel von Igepal® CO-520.

### Mesoporöse SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Über den Stöber-Prozess können nicht nur einfache sphärische SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, sondern auch poröse Nanopartikel<sup>[37], [38], [39]</sup> hergestellt werden. Hierzu muss der klassischen Stöber-Synthese neben dem Alkoxid und der Base zusätzlich noch ein Templat zugegeben werden, welches als Platzhalter für die Poren dient. Ein solches Templat kann ein langkettiges Tensid wie z.B. Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) sein.<sup>[68]</sup> Die Tensidmoleküle ordnen sich in mizellaren Strukturen an, wie in Abbildung 19 zu sehen ist, um die herum sich dann das Siliziumdioxid bildet.

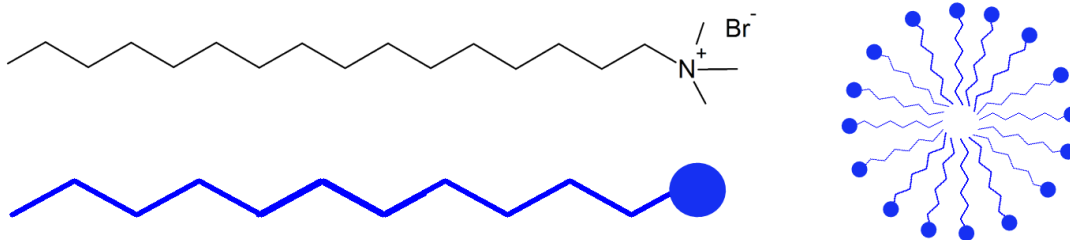


Abbildung 19: Strukturformel und schematische Darstellung von CTAB.

Durch die basische Katalyse entstehen wie bei der klassischen Silicapartikelsynthese nach Stöber immer noch SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, allerdings von poröser Struktur. Die stäbchenförmigen CTAB-Mizellen ordnen sich hexagonal an, so dass ein geordnetes Netzwerk dieser „Platz-

halter“ entsteht. Nach der Bildung von Siliziumdioxid um diese Mizellen zu Nanopartikeln, kann das Tensid aus den Partikeln entfernt werden und es bleiben geordnete Porenstrukturen im gesamten Partikel zurück. Für ein genaueres Verständnis ist dies in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

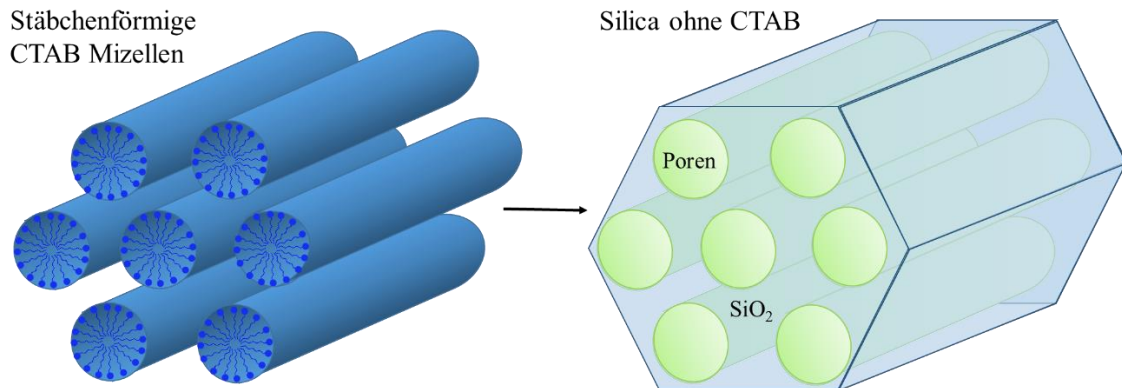


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Mizellenanordnung und der Silicabildung um die “Platzhalter Mizellen”.

Die Poren haben einen Durchmesser von ca. 2-3 nm, was aus der doppelten Länge eines CTAB-Moleküls resultiert.<sup>[69]</sup> Es sind somit mesoporöse (nach IUPAC: 2-50 nm große Poren) Siliziumdioxidnanopartikel (mSiO<sub>2</sub>-NP) entstanden. Dieses Wachstum um die Mizellen herum zu einem Gesamt Netzwerk, welches dann mit Poren durchzogen ist, ist nur möglich, da keine Fernordnung in dieser Struktur vorhanden ist. Mit einem kristallinen Material, wie zum Beispiel TiO<sub>2</sub>, ist die Bildung von porösen Strukturen über diesen templatvermittelten Weg nicht möglich.<sup>[70]</sup>

Die perfekt hexagonal angeordneten Poren führen in der Röntgendiffraktometrie zu diskreten Streumaxima im Kleinwinkelbereich, die sich durch die Translationsperiodizität der Porenstruktur ergeben. Die mesoporösen SiO<sub>2</sub>-Partikel zeigen aufgrund ihrer amorphen Struktur zwar keine Reflexe im Röntgendiffraktogramm, dafür aber aufgrund ihrer geordneten Porenstruktur. Aus den Reflexen können die d-Werte bestimmt werden, über die dann der Porenabstand  $a$  (Abbildung 21) berechnet werden kann. Solch ein Diffraktogramm mit den aus den Poren resultierenden Reflexen im Kleinwinkelbereich ist in Abbildung 21 gezeigt.

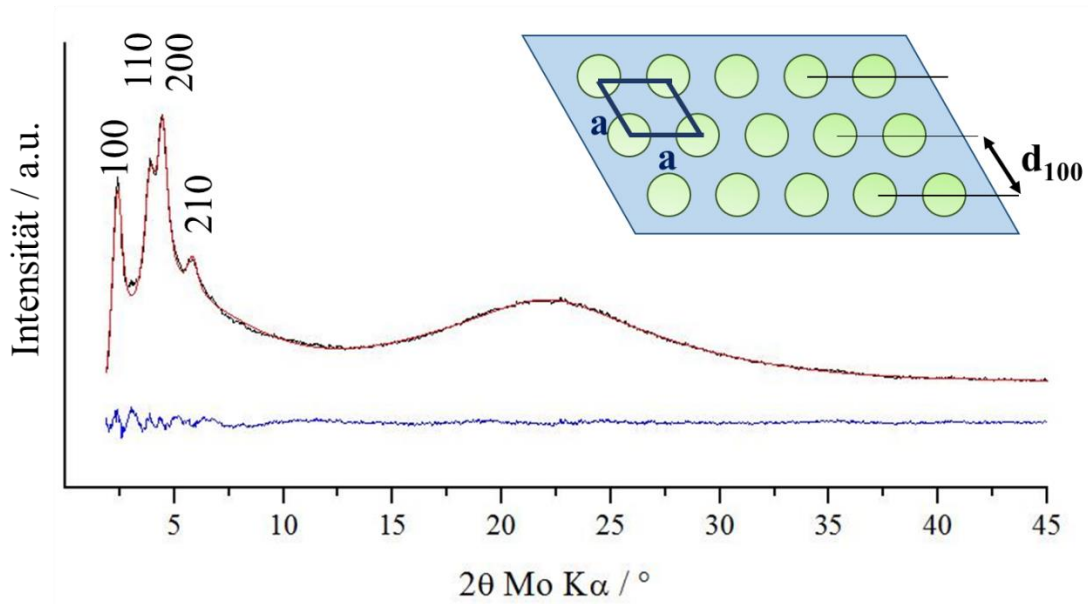


Abbildung 21: Röntgendiffraktogramm von mesoporösen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. Schwarz: Experiment, rot: Anpassung, blau: Differenz.  $d_{100} = 37,2 \text{ \AA}$ ,  $d_{110} = 22,8 \text{ \AA}$ ,  $d_{200} = 19,8 \text{ \AA}$  und  $d_{210} = 15,2 \text{ \AA}$ ,  $a = 43 \text{ \AA}$ .<sup>[66], [70]</sup>

### 3.2.1.1 Stabilisierung von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln in Lösung

Wie bereits in Abbildung 15 gezeigt sitzen auf der Oberfläche von Silicananopartikeln hauptsächlich deprotonierte Hydroxylgruppen, weshalb sie eine negative Oberflächenladung besitzen. Diese negative Ladung reicht aus um die Partikel in wässriger Lösung zu stabilisieren, ohne dass eine Agglomeration stattfindet (siehe Kapitel 2, Abbildung 2). Für eine noch bessere Stabilisation können die Partikel zusätzlich mit einem PEG-Liganden funktionalisiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete PEG trägt auf der einen Seite eine Trimethoxysilangruppe, die direkt auf die Partikeloberfläche kondensiert werden kann und so kovalent an den Partikel gebunden ist. Über diesen Weg können auch funktionelle Gruppen auf die Partikeloberfläche gebracht werden, die für eine spätere Funktionalisierung mit spezifischen Zielstrukturen von Nöten sind, da die vorhandenen Hydroxylgruppen chemisch relativ inert sind.



Es werden also Gruppen auf der Oberfläche benötigt, an die über einfache Kopplungsmechanismen verschiedene Zielstrukturen angebracht werden können. Für diesen Zweck bieten sich freie Aminogruppen als gute funktionelle Gruppen an, die ebenfalls über einen Silananker auf die Partikeloberfläche angebracht werden können. Hierzu wurde das (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APS) verwendet, welches über die Trimethoxysilangruppe an die Silicaoberfläche binden kann und somit freie  $\text{-NH}_2$ -Gruppen auf der Partikeloberfläche zur Verfügung stellt. In Abbildung 22 ist diese Funktionalisierung schematisch dargestellt.

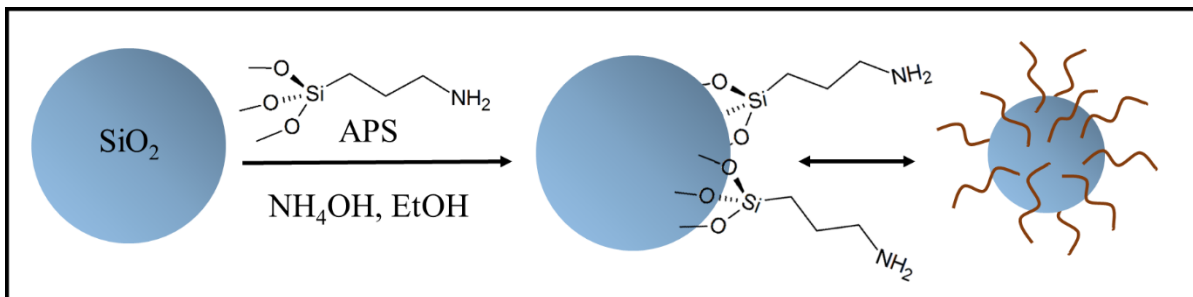


Abbildung 22: Schematische Darstellung der APS-Funktionalisierung der Silicananopartikel.

## 3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

### 3.2.2.1 $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel nach Stöber

Zur Darstellung von sphärischen amorphen Siliziumdioxidpartikeln wurde eine abgewandelte Methode nach Stöber *et al.* <sup>[64]</sup> verwendet. Hierbei wurde die kontrollierte Hydrolyse und Polykondensation von Tetraethylorthosilikat im basischen Milieu ausgenutzt. Um eine zu schnelle und damit unkontrollierte Bildung von  $\text{SiO}_2$  zu verhindern, wurde die Reaktion in Ethanol mit geringen Zusätzen von Wasser und Ammoniak durchgeführt. Über diesen Weg können Silicapartikel in einem Größenbereich von 25 bis zu über 500 nm hergestellt werden, wobei für die in dieser Arbeit vorgestellten Anwendungen nur Partikel im Bereich von 25 bis 100 nm eine Rolle spielen. Die entscheidenden Reaktionsparameter zur Größen- und Formkontrolle der Nanopartikel sind der pH-Wert und die Reaktionstemperatur. Mit steigender Reaktionstemperatur und konstantem pH-Wert sinkt der Durchmesser der Nano-

partikel und so können beim angewendeten Standardverfahren im Temperaturbereich von 35°C bis 75°C Partikel im Bereich von 500 nm bis 25 nm hergestellt werden. In Abbildung 23 sind Silicananopartikel gezeigt, die bei verschiedenen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden.

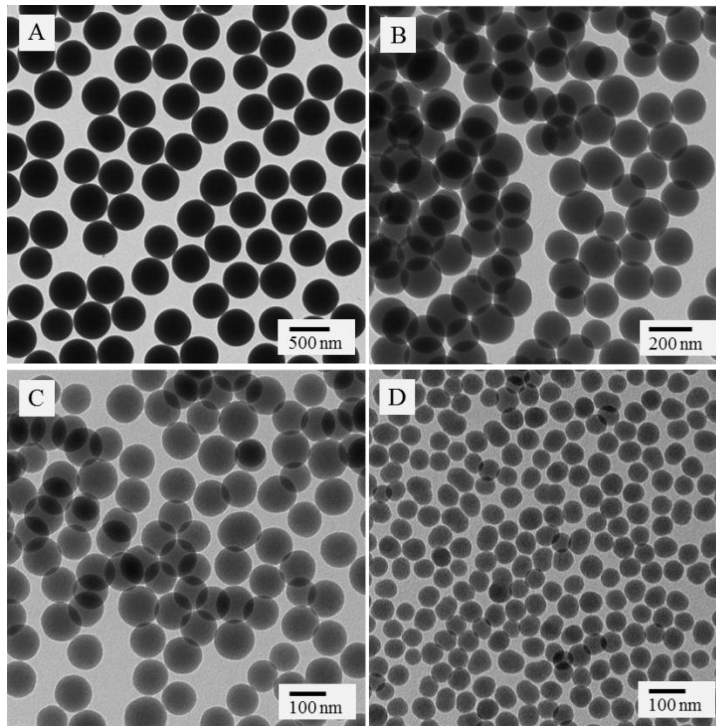


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in verschiedenen Größen, die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden. A: Raumtemperatur (~ 450 nm), B: 35°C (~ 150 - 200 nm), C: 65°C (~ 100 - 120 nm), D: 75°C (~ 40 - 60 nm).

Zusätzlich kann durch Erniedrigung des pH-Wertes eine Verringerung des Durchmessers erreicht werden, wobei der pH-Wert nicht unbegrenzt erniedrigt werden kann. Wird die kritische pH-Wert-Grenze ( $pH_{krit}$ ) unterschritten, werden die Partikel polydispers und es kommt zu einer Veränderung der Form, welche in Abbildung 24 gezeigt ist.

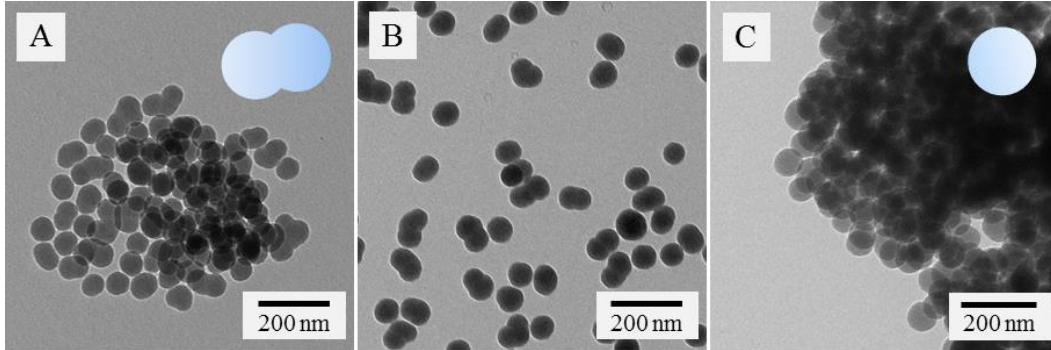


Abbildung 24: TEM-Aufnahmen von Partikeln, die unter der kritischen pH-Wert Grenze (A und B) und über  $\text{pH}_{\text{krit}}$  (C) synthetisiert wurden.

Es liegen dann keine Sphären mehr vor, sondern die Partikel haben Ausstülpungen oder sind zu einer Art Dimer zusammengelagert (Abbildung 24 A und B). So können zum Beispiel bei Raumtemperatur und einem pH-Wert zwischen 11,4 bis 12 Partikel im Bereich von 50 nm bis 200 nm hergestellt werden. Abbildung 25 zeigt TEM-Aufnahmen von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln in Abhängigkeit des pH-Wertes der Reaktion bei zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen.

Zusätzlich liegt eine Abhängigkeit zwischen dem kritischen pH-Wert und der Temperatur vor. Bei verschiedenen Reaktionstemperaturen variiert somit  $\text{pH}_{\text{krit}}$ . Liegt dieser bei einer Reaktionstemperatur von  $45^\circ\text{C}$  bei 11,4 ist er bei höheren Temperaturen leicht nach oben verschoben. Es muss also der ideale pH-Wert für die verschiedenen Reaktionstemperaturen gefunden werden, um die Partikelgröße und –form im gewünschten Bereich zu erhalten. Um Partikel zwischen 50 nm und 100 nm darzustellen, sollte die Reaktionslösung im Temperaturbereich von  $60^\circ\text{C}$  bis  $75^\circ\text{C}$  einen pH-Wert von 11,4 bis 12 besitzen.

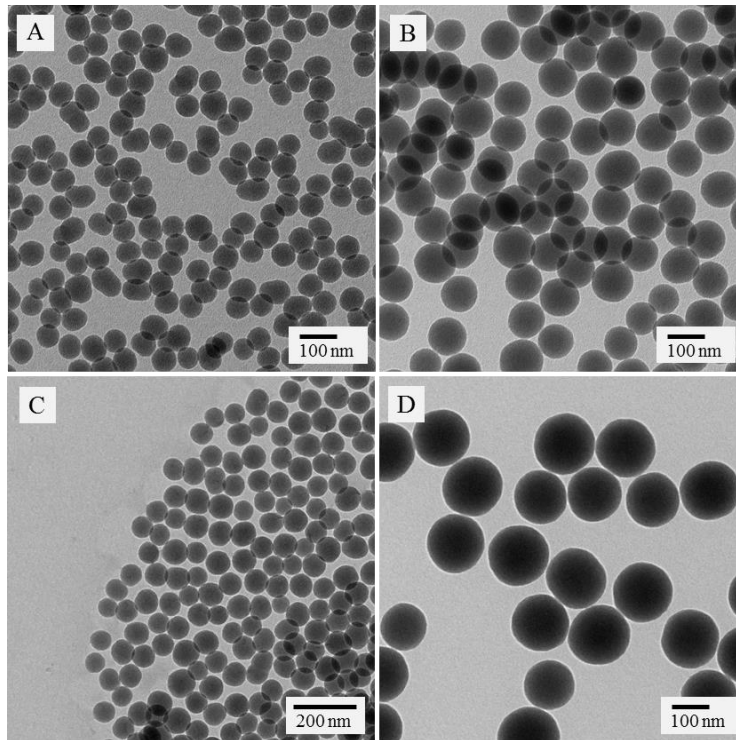


Abbildung 25: TEM-Aufnahmen von  $\text{SiO}_2$ -Partikeln in Abhängigkeit des pH-Wertes der Reaktion, bei zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen. A und B: Zugabe von 1 mL ( $\sim 50$  nm) und 1,5 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\sim 100$  nm) bei einer Reaktionstemperatur von  $65^\circ\text{C}$ , C und D: Zugabe von 0,8 mL ( $\sim 80$  nm) und 0,9 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\sim 150$  nm) bei einer Reaktionstemperatur von  $45^\circ\text{C}$ .

Über diese Parameter (Reaktionstemperatur und pH-Wert) kann somit insgesamt eine Größensteuerung von sphärischen Silicananopartikeln im Bereich von 50 – 400 nm erreicht werden. In Abbildung 26 sind dazu die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt (genaue Reaktionsparameter sind in Kapitel 8.1.8 zu finden).

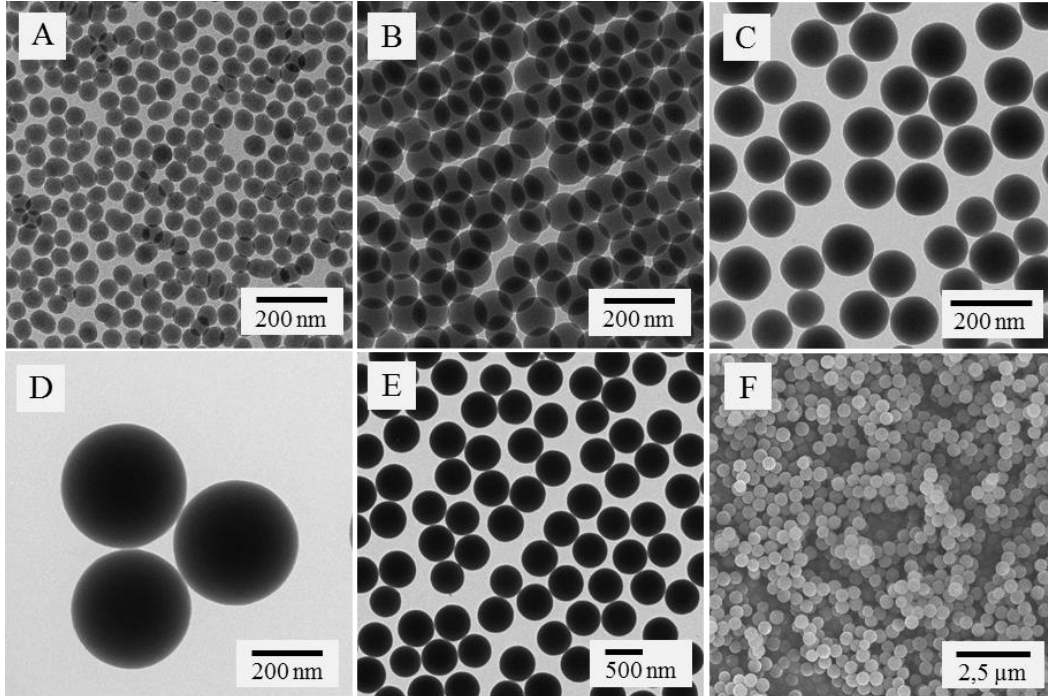


Abbildung 26: TEM-Aufnahmen von Silicananopartikeln in verschiedenen Größen zwischen 50 und über 400 nm (A~50 nm, B~100 nm, C~120 nm, D~320 nm, E~400 nm) und eine SEM Aufnahme (F) von 400 nm großen Silicananopartikeln. Größe- und Form der Partikel wurden über die Temperatur und den pH-Wert der Reaktion gesteuert.

Die Morphologie und Dispersität der über diesen Weg hergestellten Partikel sind allerdings noch nicht zufriedenstellend, besonders bei den kleineren Partikeln. Es können kaum ganzheitlich monodisperse Proben (Standardabweichung unter 5%) hergestellt werden, was für die spätere Anwendung Nachteile hat. Wenn form- und größenabhängige Effekte der Nanopartikel zu erwarten sind, könnten diese mit polydispersen Proben nicht festgestellt werden, zusätzlich können eintretende Effekte schlechter oder gar nicht erklärt werden, da unklar wäre, was sie verursacht. Diese Probleme sollen über einen abgewandelten Syntheseweg, der eine bessere Form- und Größenkontrolle erreichen soll, umgangen werden und sind in Kapitel 3.2.2.2 diskutiert.

### **Funktionalisierung der SiO<sub>2</sub>-Partikel**

Die Partikel sollen in verschiedenen Bereichen der Krebsimmuntherapie angewendet werden (Kapitel 4-6). Doch bevor dies möglich ist, müssen funktionelle Gruppen auf die Siliziumdioxidoberfläche aufgebracht werden. Hierzu wurden die SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, wie bereits in der Theorie (siehe 3.2.1.1) beschrieben, mit Aminogruppen funktionalisiert. Die erfolgreiche Funktionalisierung kann über eine Oberflächenpotentialmessung der Partikel vor und nach der Funktionalisierung überprüft werden. Nach der Synthese haben die Nanopartikel ein Zetapotential von  $-8 \pm 2$  mV. Die Partikel wurden mit verschiedenen Mengen APS funktionalisiert, um den Sättigungsbereich zu bestimmen. Dies bedeutet, dass sich eine maximale Anzahl an Aminogruppen auf der Oberfläche befindet und somit die größtmögliche Ladung erreicht ist. Das maximale Zetapotential, welches durch die Funktionalisierung mit Aminogruppen erreicht werden konnte, betrug  $10 \pm 2$  mV. Für jegliche Anwendungen wurden die Partikel auf diese Weise funktionalisiert, sodass immer eine maximale Anzahl an funktionellen Gruppen vorhanden war, an die dann die benötigten Zielstrukturen gekoppelt werden konnten.

#### **3.2.2.2 SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel über die reverse Mikroemulsion**

Im Vergleich zur klassischen Stöber-Methode stellt die reverse Mikroemulsion einen alternativen Syntheseweg dar. Diese Methode ist bereits in der Literatur zum Umhüllen von Metalloxidnanopartikeln mit einer Silicaschale bekannt.<sup>[67]</sup>

Dieser Synthese liegt ebenfalls die Hydrolyse und Polykondensation von Tetraethylorthosilikat im basischen Milieu zugrunde, allerdings findet die Reaktion in kleinsten Mikrotröpfchen aus Wasser bzw. Ammoniumhydroxid statt, die zunächst langsam in die ölige Phase getropft und mit Hilfe eines Tensids stabilisiert werden. Die vorgebildeten wässrigen Tröpfchen unterstützen die Größen- und Formkontrolle der Nanopartikel. In Abbildung 27 sind Siliziumdioxidnanopartikel in zwei verschiedenen Größen gezeigt, welche über den Weg der reversen Mikroemulsion synthetisiert wurden.

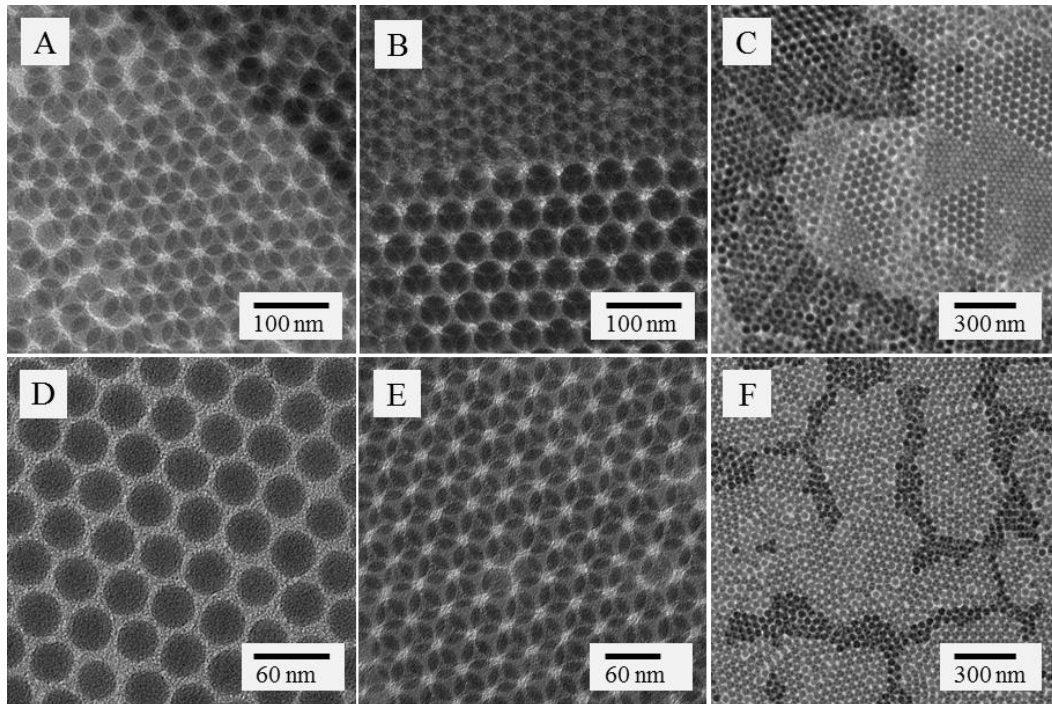


Abbildung 27: SiO<sub>2</sub>-Partikel aus der reversen Mikroemulsion in zwei verschiedenen Größen. A-C: 45 nm, D-E: 30 nm. Zusätzlich zeigen alle Aufnahmen die Bildung von dichtesten Kugelpackungen und Überstrukturen in unterschiedlichen Bereichen der TEM-Grids.

Über diesen Syntheseweg können monodisperse, sphärische Siliziumdioxidnanopartikel hergestellt werden. Aufgrund ihrer hohen Symmetrie und Monodispersität bilden die Partikel bei der Präparation auf die mit Kohlenstoff beschichteten TEM-Grids dichteste Kugelpackungen. An verschiedenen Stellen sind unterschiedlich dicke Lagen der Partikelkugeln zu finden, von der Monolage bis hin zu drei oder mehr lagigen Schichten, die dann über verschieden große Bereiche Überstrukturen ausbilden.

Auch über den hier beschriebenen Syntheseweg können über eine Anpassung der Syntheseparameter (zugegebene Menge an NH<sub>4</sub>OH, TEOS und Igepal<sup>®</sup> CO-520) verschieden große Partikel dargestellt werden (genaue Informationen, siehe Kapitel 8.1.9). Allerdings ist nur eine Variation in einem Größenbereich von 25 bis 60 nm möglich (Abbildung 28).

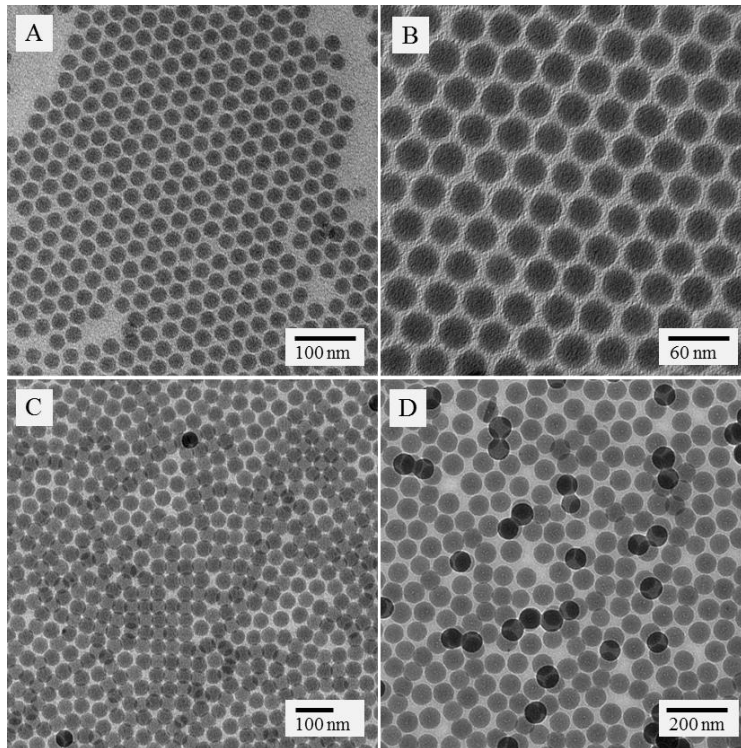


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln in den vier verschiedenen einstellbaren Größen. A: 25 nm, B: 35 nm, C: 45 nm und D: 60 nm.

Der Weg über die reverse Mikroemulsion liefert so zwar die einheitlicheren  $\text{SiO}_2$ -Partikel in besserer Qualität, besitzt allerdings einen limitiert darstellbaren Größenbereich und liefert bei weitem geringere Ausbeuten. Hierbei liegen die Ausbeuten je nach Partikelgröße bei 10 bis 50 mg, wohingegen die Ausbeuten in der klassischen  $\text{SiO}_2$ -Synthese je nach Partikelgröße im Bereich von 50 bis 500 mg liegen.

Für die weitere Anwendung wurden diese Silicananopartikel ebenfalls mit APS funktionalisiert. Die ermittelten Zetapotentiale liegen im selben Potentialbereich wie die der Silica-partikel aus Kapitel 3.2.2.1, sowohl vor, als auch nach der Aminogruppenfunktionalisierung.



### 3.2.2.3 Mesoporöse SiO<sub>2</sub>-Partikel

Über die in Kapitel 3.2.2.1 dargestellte Synthese können nicht nur einfache sphärische Siliziumdioxidnanopartikel hergestellt, durch wenige Variationen und Zusätze können auch komplexere Strukturen erhalten werden. Unter Zugabe eines langkettigen Tensids, wie CTAB können im wässrig-basischen Milieu mesoporöse Strukturen von SiO<sub>2</sub> erhalten werden (Abbildung 29). Hierbei dient CTAB beim Wachstum der Partikel als „Platzhalter“ für die Poren, indem das Silica um die Tensidmoleküle wächst, so dass sich eine poröse Struktur ausbildet. Temperatur und pH-Wert der Reaktionslösung besitzen hier den gleichen Einfluss wie bei den nicht porösen Silicananopartikeln nach Stöber. Je höher die Temperatur und je niedriger der pH-Wert, desto kleiner werden die Partikel. Der Einfluss dieser Parameter wurde an dieser Stelle allerdings nicht genau untersucht, auf ihn wird in Kapitel 3.3.2.1 nochmals genauer eingegangen.

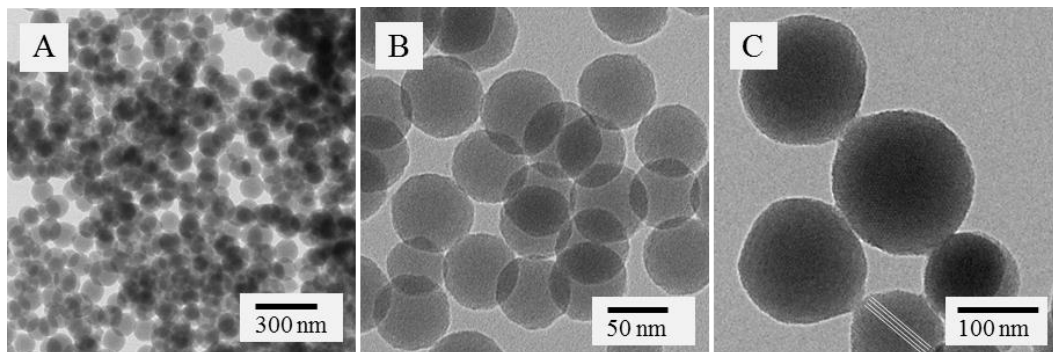


Abbildung 29: Mesoporöse SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel in verschiedenen Größen. In Abbildung C ist mit den weißen Linien die Porenstruktur in Längsrichtung der Partikel angedeutet.

Aus den fertigen mesoporösen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (mSiO<sub>2</sub>) kann das CTAB durch mehrmaliges Waschen oder Auskochen der Partikel in einer ethanolischen Ammoniumnitratlösung entfernt werden. Die Kontrolle, ob kein CTAB mehr in den Partikeln vorhanden ist, kann sowohl qualitativ als auch quantitativ erfolgen. Da das Tensid in Wasser sehr stark schäumt, können die Nanopartikel so lange mit Wasser gewaschen werden bis keine Schaumbildung mehr eintritt, zusätzlich kann dies mit Hilfe der IR-Spektroskopie überprüft werden (Abbildung 30).

Bei den Nanopartikeln, die kein CTAB mehr in den Poren aufweisen fehlen die charakteristischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen des Tensids bei  $2853\text{ cm}^{-1}$  und  $2923\text{ cm}^{-1}$ .

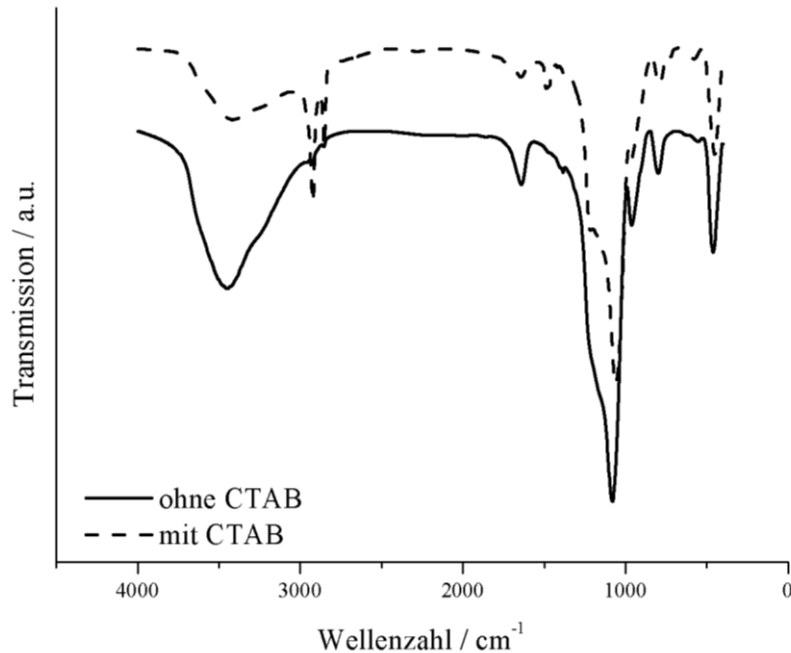


Abbildung 30: IR-Spektrum von mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln mit und ohne CTAB.

Die Porengröße der Silicananopartikel ist durch die Ausmaße der CTAB-Moleküle vorgegeben und entspricht, wie bereits in der Theorie beschrieben, in etwa der doppelten Länge eines Tensidmoleküls. Um dies nachzuweisen kann die Porengröße mit Hilfe der Physisorption bestimmt werden. Diese Methode gibt zusätzlich Aufschluss über die Form der Poren und die Gesamtoberfläche der Nanopartikel. Es wird die Isotherme, siehe Abbildung 31, bestehend aus dem Adsorptionsast und dem Desorptionsast gemessen, aus deren Form der Porengrößenbereich (Mesoporen, Makroporen, Mikroporen) und die Porenform bestimmt werden können.

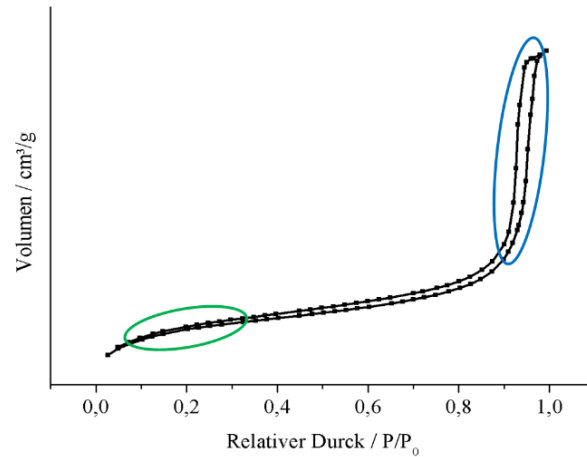


Abbildung 31: Isotherme aus der Gasadsorptionsmessung von mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

Aus dem ersten Drittel der Isotherme (grüner Bereich) wird die Gesamtoberfläche der Partikel berechnet und aus dem letzten Drittel (blauer Bereich/Hysterese) kann die Porengrößenverteilung bestimmt werden.

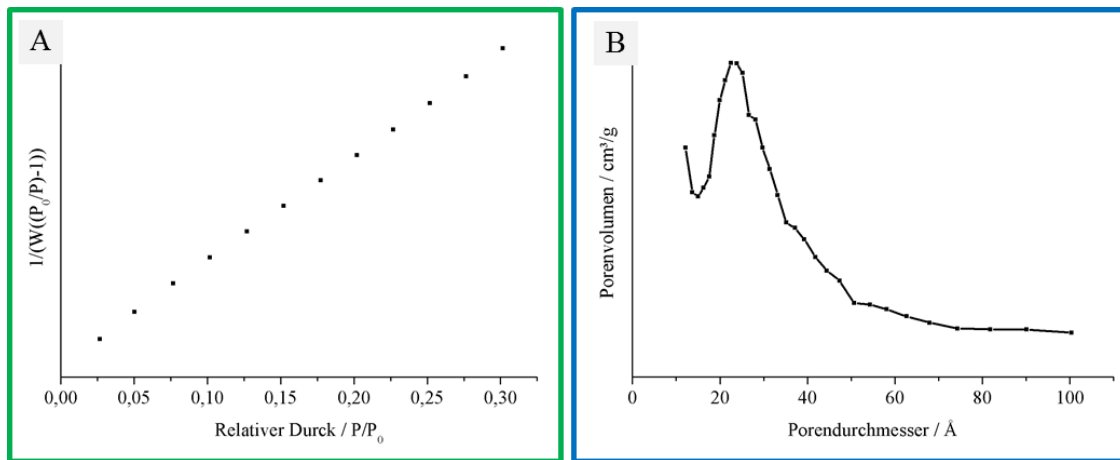


Abbildung 32: A: BET-Gerade zur Bestimmung der Partikeloberfläche. B: Porengrößenverteilung der Partikelporen.

In Abbildung 32 A ist die BET-Gerade aus dem ersten Drittel der Isotherme aufgetragen, deren Steigung der Partikeloberfläche entspricht. Die nach dieser Methode ermittelte Oberfläche der mSiO<sub>2</sub>-Partikel beträgt 981 m<sup>2</sup>/g, in der Literatur sind Werte der gleichen Größenordnung zu finden. <sup>[68]</sup> Abbildung 32 B zeigt die über die BJH-Methode berechnete Porengrößenver-

teilungsfunktion der Partikel. Es handelt sich wie erwartet um zylindrische Poren (bestimmt durch den Isothermenverlauf und die Hystereseform<sup>[71]</sup>), deren Porengrößenverteilung recht schmal ist, was bereits aus der eng verlaufenden Hysterese zu erkennen ist. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Porengröße von 2,4 nm ermittelt.

Zur besseren Form- und Größenkontrolle von mesoporösen Silicananopartikeln werden *in situ* zunächst nicht poröse SiO<sub>2</sub>-Partikel synthetisiert, die dann mit einer porösen Schicht umhüllt werden.<sup>[114]</sup> So entstehen SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub>-Kern-Schale-Partikel, die nicht durchweg porös sind und somit einen kleineren Speicherraum besitzen, der allerdings immer noch groß genug ist, um beladen zu werden. Der erste Reaktionsschritt ist identisch mit der Synthese für die nicht porösen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nach Stöber. Bevor jedoch die Reaktion abgebrochen wird und die Partikel aufgereinigt werden, erfolgt eine *in situ* Zugabe von Octadecyltrimethylsilan (C<sub>18</sub>TMS) als Platzhalter für die Poren, anstelle des zuvor verwendeten CTAB. Zusätzlich wird nochmals TEOS hinzugegeben, um ausreichend Material zur Verfügung zu stellen um die Silicahülle aufzubauen. Je nach Anwendung ist daher zu entscheiden ob eine durchweg poröse Hülle oder eine sehr hohe Monodispersität der Partikel von höherem Interesse ist. Die so hergestellten Kern-Schale Partikel sind in Abbildung 33 dargestellt.

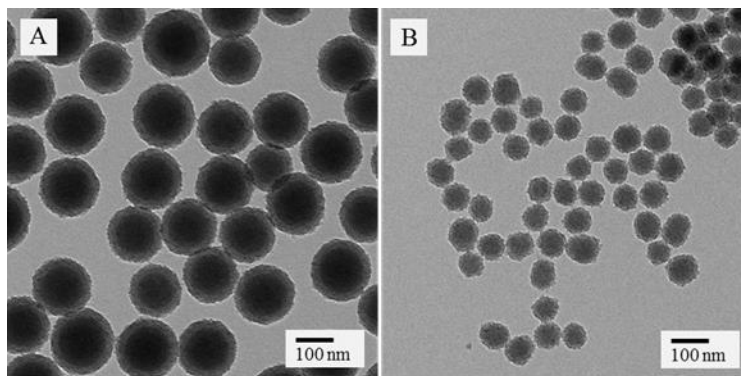


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub>-Partikeln.

Die so erhaltenen „schwammartigen“ Silicananopartikel sollen in der biomedizinischen Anwendung als Transporter (Speicher) fungieren, zum Beispiel sollen Wirkstoffe in die Poren der Partikel eingebracht werden, um sie an anderer Stelle wieder freizusetzen. Bevor über

solch einen Wirkstofftransport nachgedacht werden kann, muss überprüft werden, ob die Partikel (zyto-)toxisch sind. Hierzu wurde die Zytotoxizität der Nanopartikel an dendritischen Zellen getestet, die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

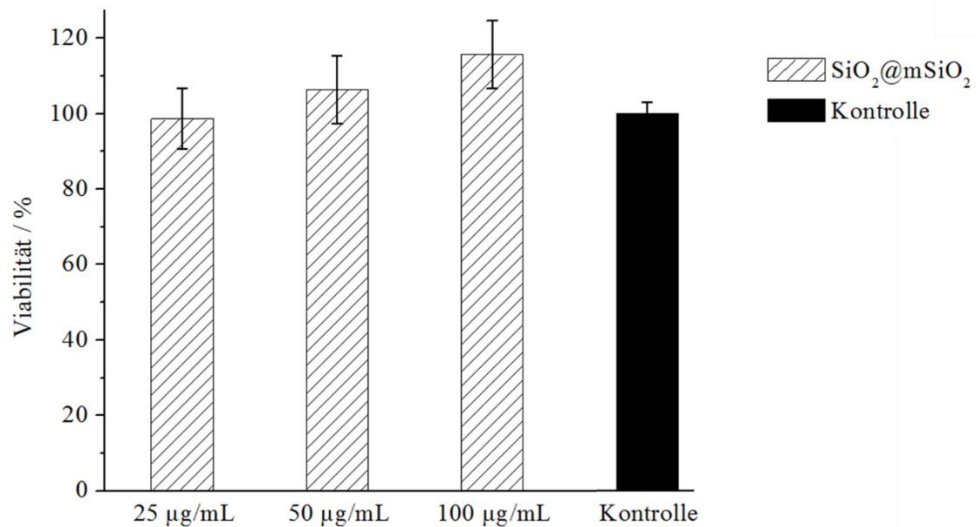


Abbildung 34: Zytotoxizitätstest von mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln an dendritischen Zellen (Inkubationszeit von 24 h, Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz).

Die Viabilität der Zellen wird bei allen drei eingesetzten Konzentrationen nicht herabgesetzt, weshalb gesagt werden kann, dass die Nanopartikel in diesem Konzentrationsbereich keine zytotoxische Wirkung zeigen.

Für den Wirkstofftransport muss weiterhin geklärt werden, mit welchen Materialien die Partikel beladen werden können und wie schnell sie wieder aus den Partikeln heraus diffundieren. Bei vielen Wirkstoffen handelt es sich um sehr große Moleküle, wie Oligonucleotide oder Proteine, deren Ausmaße den Porendurchmesser von 2,4 nm überschreiten. Dieses System muss somit zunächst mit niedermolekularen Wirkstoffen wie nicht-steroidalen Antirheumatika getestet werden. Die mesoporösen Siliziumdioxidnanopartikel wurden dazu mit vier verschiedenen Wirkstoffen, wie Ibuprofen, Acetylsalicylsäure, Diclofenac und Novalgin<sup>®</sup> beladen. Hierzu wurden die Substanzen im Überschuss mit den Partikeln zusammengegeben und 24 h gerührt. Über die folgende Gleichgewichtseinstellung

diffundieren die Wirkstoffe in die Poren der Partikel ein. Für den Nachweis wie lange die Wirkstoffe in den Partikeln bleiben und wie lange es dauert, bis alles aus den Partikeln wieder heraus diffundiert ist, wurden die Nanopartikel abzentrifugiert und das Partikelpellet mit einer Pufferlösung (PBS) bedeckt. Sobald der Puffer im Zentrifugenrohr ist, beginnen die Wirkstoffe aus den Nanopartikeln heraus zu diffundieren und es können zeitliche Proben (1 min bis 48 h) aus der Pufferlösung entnommen werden. Alle verwendeten Arzneistoffe sind UV-Vis aktiv und so konnte der zeitliche Verlauf der Wirkstoffabgabe aus den Partikeln mit Hilfe von UV-Vis-Spektren der Pufferproben dokumentiert werden. Abbildung 35 zeigt die Abgabepprofile der einzelnen Pharmazeutika in Abhängigkeit von der Zeit.

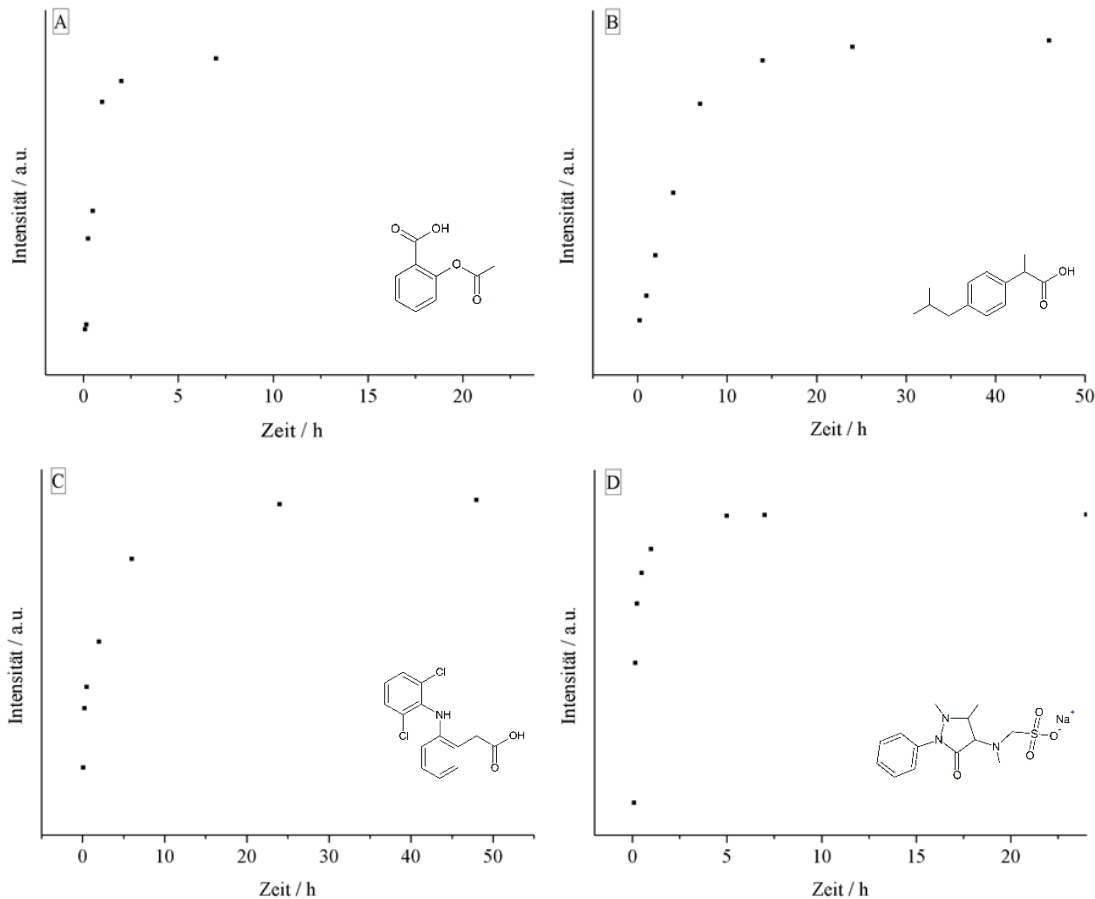


Abbildung 35: Wirkstoffabgabepprofile von A: Acetylsalicylsäure, B: Ibuprofen, C: Diclofenac und D: Novalgin®.

Alle vier Abgabeprofile zeigen, dass bereits nach 24 Stunden eine Sättigung erreicht ist, die Abgabe ist somit vollständig beendet. Bereits nach 5 h ist mehr als die Hälfte aller vier Wirkstoffe aus den Partikelporen diffundiert, was für die meisten Anwendungen ein zu kurzes Zeitfenster darstellt.

Die Pharmazeutika müssen somit daran gehindert werden zu schnell aus den Partikeln heraus zu diffundieren, was über eine Bindung<sup>[72]</sup> der selbigen an der Partikeloberfläche, einen pH-Wert gesteuerten Entladungsmechanismus<sup>[73]</sup> oder eine Umhüllung der einzelnen Partikel, zum Beispiel mit einer Lipiddoppelschicht,<sup>[74]</sup> erreicht werden könnte.

Zusätzlich wurde die Wirkstoffabgabe bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Hierzu wurden die Partikel mit Ibuprofen beladen und bei Temperaturen von 37°C, 26°C und 7°C in PBS-Puffer entladen. Die Abgabeprofile sind bis zu einem Zeitraum von 8 Stunden in Abbildung 36 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Temperatur die Abgabe der Wirkstoffe beschleunigt wird, was auf die höhere Diffusionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen, zurück zu führen ist.

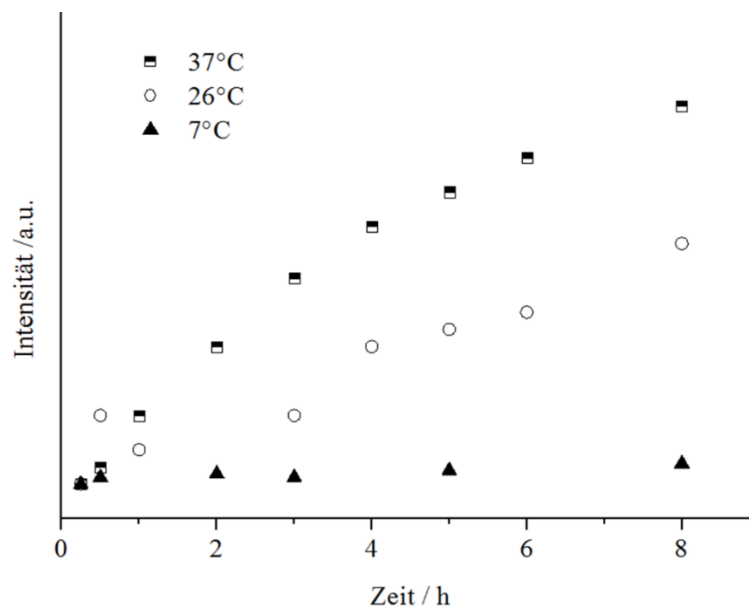
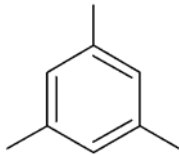
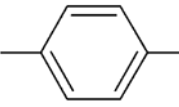
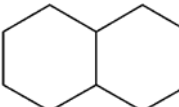
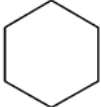
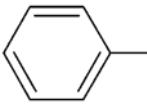


Abbildung 36: Wirkstoffabgabeprofile bei drei verschiedenen Temperaturen.

Für einige Anwendungen ist es wie bereits erwähnt erstrebenswert, Nanopartikel mit größeren Poren zur Verfügung zu haben, um größere Wirkstoffe wie Proteine in die Poren einbringen zu können. Dazu wurden Versuche durchgeführt,  $m\text{SiO}_2$ -Nanopartikel mit größeren Poren herzustellen und die Poren von bereits fertigen porösen Partikeln zu vergrößern. Die direkte Herstellung von Partikeln mit größeren Poren gestaltete sich schwierig, da dazu ein längeres Tensid als CTAB hätte zum Einsatz kommen müssen. Geringe Größenabweichungen der Kettenlänge, wie zum Beispiel beim Octadecyltrimethylammoniumbromid ( $\text{C}_{18}\text{TAB}$ ) oder  $\text{C}_{20}\text{TAB}$ , führten jedoch zu keiner signifikanten Vergrößerung der Poren. Da die eingesetzten Tenside, alternativ wären auch Polymere denkbar, in polaren Lösungsmitteln löslich sein müssen und nicht verknäulen oder verkleben dürfen, wird die Auswahl an dieser Stelle sehr eingeschränkt. Daher wurde versucht, die Poren bereits fertiger poröser Partikel zu vergrößern.<sup>[75]</sup> Dazu wurden die mesoporösen Silicananopartikel mit verschiedenen hydrophoben Reagenzien (Schwellschubstanzen) unter Hochdruck im Autoklaven behandelt. Bei einem Druck bis zu 200 bar werden die organischen Flüssigkeiten in die Poren der Partikel gedrückt und „sprengen“ diese ein Stück weit auf. Über die Gasadsorption wurden die Porengrößenverteilungen erneut ermittelt. So konnte eine Vergrößerung der Poren von 0,7 - 1,5 nm erreicht werden (Tabelle 1).



Tabelle 1: Vergrößerung der Porendurchmesser mit Hilfe von verschiedenen organischen Lösemitteln.

Schwellschubstanz	Siedepunkte	Strukturformeln	Porendurchmesser
Trimethylbenzol	165°C		3,2 nm ± 0,2 nm
Xylol	138°C		3,4 nm ± 0,2 nm
Dekalin	191°C (Isomergemisch)		3,6 nm ± 0,2 nm
Cyclohexan	81°C		3,6 nm ± 0,2 nm
Toluol	111°C		3,9 nm ± 0,2 nm

Es scheint unter allen eingesetzten Stoffen keinen Trend zu geben, der die Eigenschaften, wie Molekülgröße oder Siedepunkt, einen Einfluss auf die Porenerweiterung haben. Werden allerdings verwandte Moleküle, wie zum Beispiel die Reihe der Alkylbenzole betrachtet, kann durchaus ein Trend erkannt werden. In diesem Falle können größere Poren erreicht werden, je weniger Reste der Benzolring trägt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Moleküle untereinander weniger sterisch gehindert sind und somit mehr in die Poren eindringen können, was dann zu einer größeren „Sprengkraft“ führt. Mizutani *et al.* setzen hierzu Partikel ein, die noch das Templat aus der Synthese in den Poren tragen. Sie berichten, dass die Wechselwirkung zwischen dem langkettigen Templat und den kurzkettigen eingesetzten „Sprengsubstanzen“ einen Einfluss auf den Austausch beider Substanzen haben. Es wird

postuliert, dass je kleiner die zugesetzte Substanz ist, desto leichter ist der Austausch und desto mehr befindet sich davon in den Poren, was dann wiederum dazu führt, dass hier die Porenaufweitung am größten ist.<sup>[75]</sup>

Genau betrachtet sind bei allen eingesetzten organischen Substanzen die Unterschiede in den Porengrößen allerdings sehr gering, was eine Diskussion über den zugrundeliegenden Mechanismus erschwert. Festzuhalten ist, dass die Poren der Silicananopartikel um  $1,1 \pm 0,4$  nm erweitert werden konnten, was das Anwendungsgebiet etwas erweitert aber immer noch nicht zufriedenstellend groß macht. Sehr große Substanzklassen können so auch weiterhin nicht in die Poren eingebracht werden oder nur sehr schwierig, wenn deren Ausmaße zum Beispiel nur in zwei Raumrichtungen klein genug sind. Besitzt ein Wirkstoff zum Beispiel eine längliche Struktur, wie ein Oligonucleotid oder siRNA welche quasi stäbchenförmig sind, können diese längs in die Poren eindiffundieren, quer allerdings nicht. Für solche Substanzen wird vermutlich zum einen eine längere Reaktionszeit (Diffusion in die Poren) benötigt, zum anderen könnten die Poren von quer adhärierten Molekülen blockiert werden, was eine weitere Diffusion in die Poren nicht möglich macht.

### 3.2.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte erfolgreich gezeigt werden wie mit Hilfe eines einfachen Sol-Gel-Prozesses, der das erste Mal von Stöber *et al.* <sup>[64]</sup> publiziert wurde, Silicapartikel in verschiedenen Größen (15 bis 500 nm) und Morphologien hergestellt werden konnten. Durch leichte, aber entscheidende Variationen dieses Prozesses konnten große Veränderungen in der Struktur der Partikel erreicht werden. Es konnten sphärische, nicht poröse SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel reproduzierbar hergestellt werden, auf deren Anwendung erst in späteren Kapiteln eingegangen wird (Kapitel 4-6).

Des Weiteren konnten mesoporöse SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, rein porös, als Kern-Schale-Partikel, hohl (siehe Anhang, E.1) oder als Stäbchen (siehe Anhang, E.2) hergestellt werden. Die Idee zur Anwendung solcher Partikel ist die der Speicherung, des Transports sowie der Freisetzung eines Wirkstoffes. Allerdings konnte gezeigt werden, dass lediglich niedermolekulare Pharmazeutika in die Poren der Partikel geladen werden können und diese sehr schnell wieder aus den Poren heraus diffundieren, zu schnell für eine potentielle Anwendung. Es wurden auch Versuche durchgeführt, größere Wirkstoffe wie siRNA oder TNF $\alpha$  in die Poren zu laden, allerdings gänzlich ohne Erfolg. Aufgrund dieser Resultate wurde für die weitere Anwendung ein anderes System entwickelt. Hier kamen nun die nicht porösen SiO<sub>2</sub>-Partikel in verschiedenen Größen zum Einsatz. Da hier keine funktionellen Stoffe in Poren geladen werden können, müssen diese an die Partikeloberfläche angebunden werden, was in den jeweiligen Anwendungsgebieten der Partikel in Kapitel 4-6 diskutiert wird.

Eine Idee zur Anwendung für die mesoporösen Partikel wäre der Einsatz eines niedermolekularen Wirkstoffs, nämlich eines antiinflammatorischen und antikoagulatorischen Pharmazeutikum wie beispielsweise Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen. Hierzu ist zu überprüfen, ob das Wirkstoffabgabefenster von 24 h für diesen Zweck ausreicht oder ob dieses über die bereits oben erwähnten verschiedenen Prozesse herausgezögert werden muss.

Zusätzlich sollen diese Partikel mit einem Liganden für entzündliches Gefäßendothel funktionalisiert werden, um selektiv an den Wirkungsort (Entzündungsort) gesteuert werden zu können. Entzündetes Endothel hat bestimmte Adhäsionsmoleküle (Rezeptoren wie ICAM-1) auf der Oberfläche exprimiert, welche zu dieser selektiven Ansteuerung ausgenutzt werden könnten. Daher sollen die Partikel neben dem antiinflammatorischen Wirkstoff zusätzlich mit einem Antikörper gegen ICAM-1 ausgestattet werden, wodurch eine Anreicherung der Partikel an dem Entzündungsort im Körper erreicht und an dem dann der entzündungshemmenden Wirkstoff freigesetzt werden könnte.

### **3.3 Metall- und Metalloxidpartikel in Kombination mit SiO<sub>2</sub>**

#### **3.3.1 Einführung und Theorie**

Um die Eigenschaften von Metall- und Metalloxidnanopartikeln, wie den Magnetismus mit den Eigenschaften der Silicananopartikel, wie die sehr gute Wasserlöslichkeit, in einem System zu vereinigen, können die verschiedenen Materialien zu einem Nanopartikel „zusammengebaut“ werden. SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel sind von Natur aus gut in polaren Lösungsmitteln dispergierbar, was auf die in dieser Arbeit vorgestellten metallhaltigen Partikel, bedingt durch ihre Syntheseroute nicht zutrifft. Sie müssen also „umfunktionalisiert“ werden, um z.B. in Wasser löslich zu sein, was für die biomedizinische Anwendung unabdingbar ist. Silica hat noch weitere gute Eigenschaften, wie eine geringe Zytotoxizität <sup>[76], [77], [78], [79]</sup> und es ist im Vergleich zu anderen Liganden zur Funktionalisierung von Nanopartikeln, wie z.B. ein Catechol-PEG <sup>[80]</sup>, relativ kostengünstig und leicht in der Handhabung. Auch das schwammartige mesoporöse SiO<sub>2</sub> kann in Kombination mit Metalloxidnanopartikeln zum Einsatz kommen. Es können also alle Arten der hier vorgestellten Siliziumdioxidnanopartikel in unterschiedlicher Form mit Metall- und Metalloxidnanopartikeln kombiniert werden. Die Umhüllung eines Metalloxidkerns mit einer Silicaschicht kann mit Hilfe der in Kapitel 3.2.1. vorgestellten Syntheseroute der reversen Mikroemulsion durchgeführt werden.

Die hydrophoben Nanopartikel werden hierzu in einem organischen Lösungsmittel, wie Cyclohexan, gelöst in dem zusätzlich das Tensid Igepal® CO-520 vorliegt. Wird in diese Mischung Ammoniak als wässrige Phase getropft bilden sich Mizellen, in deren Kern die Nanopartikel mit eingebaut werden.<sup>[81]</sup> In Abbildung 37 ist eine schematische Darstellung des Synthesewegs zu sehen.

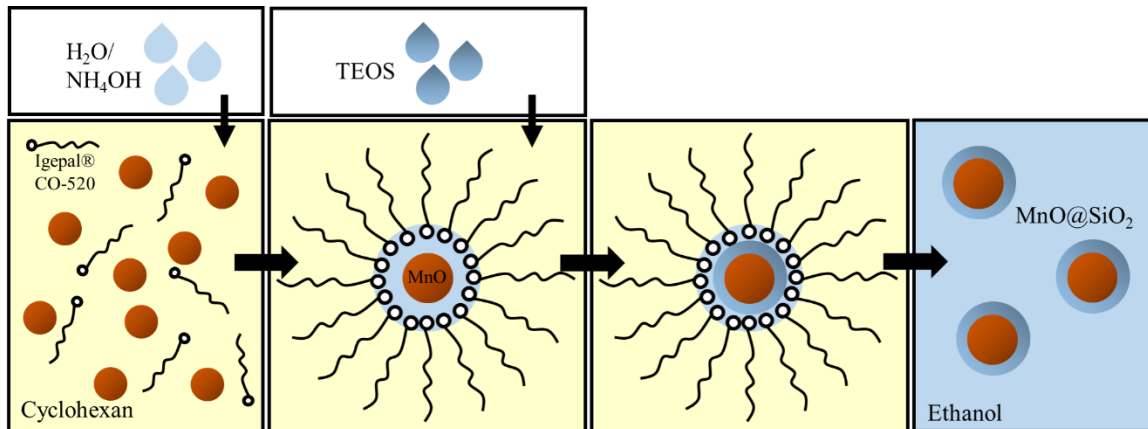


Abbildung 37: Modell zur Bildung einer Silicahülle über die reverse Mikroemulsion.

Die erhaltenen Silicananopartikelsysteme sind gut in Wasser löslich und können dadurch direkt weiter verwendet werden. Die Kern-Schale-Partikel, z.B. MnO@SiO<sub>2</sub>, können für eine Umhüllung mit einer mesoporösen Silicaschicht eingesetzt werden. Durch ihre dünne Silicahülle sind die Partikel gut in Wasser löslich und liegen und nicht agglomeriert vor. So kann eine gleichmäßige poröse Hülle um die einzelnen Partikel ausgebildet werden. Hierzu werden die Nanopartikel zu der in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen Synthese hinzugegeben. Der templatvermittelte Stöber-Prozess funktioniert hier analog zu dem der reinen porösen Partikeln. Die CTAB-Moleküle ordnen sich um die gelösten Nanopartikel an und so bildet das TEOS um diese eine poröse Hülle aus.<sup>[82]</sup>

### 3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.2.1 MnO@SiO<sub>2</sub> und MnO@mSiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von MnO@mSiO<sub>2</sub>-Kern-Schale-Nanopartikeln wurden die Manganoxidpartikel zunächst mit einer 2-4 nm dünnen, nicht porösen Silicaschicht ummantelt. Diese Umhüllung läuft in der bereits beschriebenen reversen Mikroemulsion ab, in der im Gegensatz zu den reinen SiO<sub>2</sub>-Partikeln aus der rME zusätzlich die Metalloxidpartikel in den Mizellen vorliegen und das TEOS um diese Partikel herum kondensiert und sich so eine Hülle um die hier eingesetzten MnO-Partikel bildet.<sup>[81]</sup>

Zur Verbesserung der Löslichkeit können die Partikel zusätzlich noch mit einem PEG-Silan (PEG-TES) funktionalisiert werden, welches mit seinem Silan-Anker auf die Partikeloberfläche bindet und diese durch die PEG-Kette sehr gut solubilisiert.

Während der Synthese kann nach der TEOS-Zugabe zusätzlich ein Farbstoff wie Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) oder das Isothiocyanat von Rhodamin(B) (RITC) zugegeben werden, welcher mit in die Silicahülle eingebaut wird.<sup>[67]</sup> Die Partikel werden somit fluoreszenzmarkiert und können später z.B. im Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden.

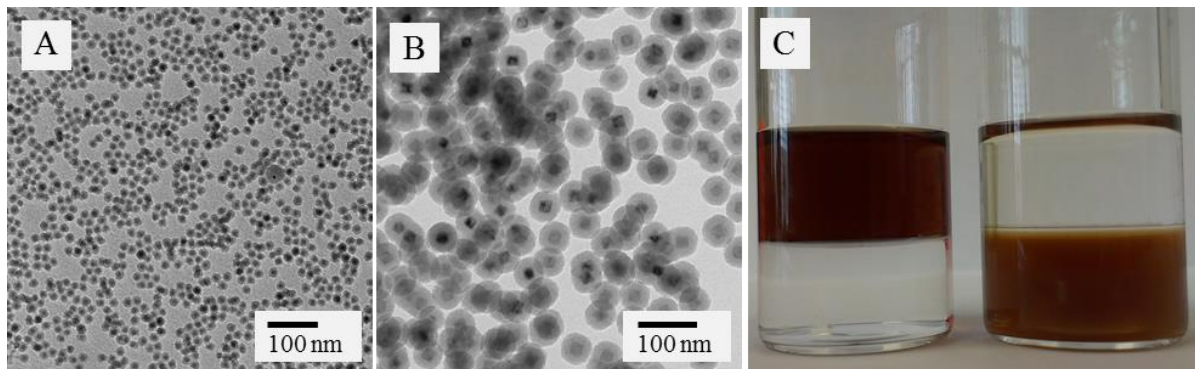


Abbildung 38: A, B: TEM-Aufnahmen von MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit unterschiedlich dicken Silicahüllen und C: MnO-Partikel gelöst in Hexan (links) im Vergleich zu MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln gelöst in Wasser (rechts).

### MnO@mSiO<sub>2</sub>

Für die Beschichtung mit einer porösen Hülle hat dieser Schritt den Vorteil, dass die Partikel bereits im polaren Medium löslich sind, da es sich hier nicht um eine reverse Mikroemulsionsreaktion handelt, wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben wurde, sondern um eine Synthese, die im wässrigen durchgeführt wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass die hydrophoben Partikel für die Umhüllung mit einer porösen Schicht in Chloroform gelöst und zur wässrigen Phase getropft werden.<sup>[82]</sup> Bevor die eigentliche Reaktion durch die Zugabe des TEOS gestartet wird, wird das Chloroform abgedampft und die Partikel liegen so ebenfalls in der wässrigen Phase vor. Dies hat allerdings den großen Nachteil, dass die Partikel sehr schnell agglomerieren. Erklärbar ist dies dadurch, dass sie sich „in sich selbst“ lösen um eine möglichst geringe Oberfläche zu haben, die in Kontakt mit dem hydrophilen Lösungsmittel steht. Tritt solch eine Agglomeration ein, kann keine Siliziumdioxidhülle um die einzelnen Partikel ausgebildet werden, sondern es entstehen riesige poröse Partikel mit mehreren Kernpartikeln.

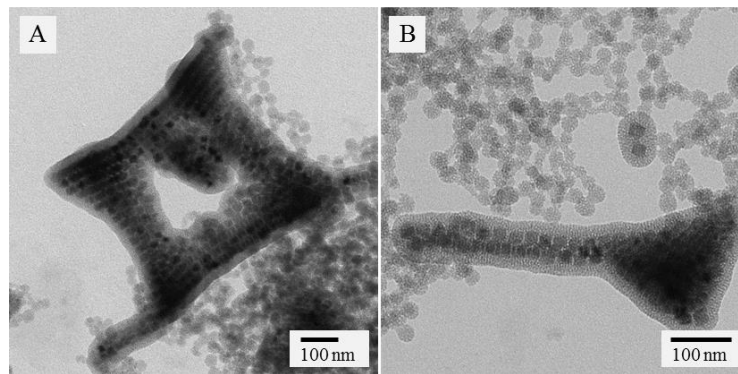


Abbildung 39: Agglomeration der in CHCl<sub>3</sub> gelösten MnO-Partikel vor der Bildung der mSiO<sub>2</sub> Hülle führt zu „Multikern“-MnO@mSiO<sub>2</sub>-Mikropartikeln.

Der Einsatz von MnO@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln in diesem Syntheseschritt gewährleistet somit gut gelöste, einzeln vorliegende Kernpartikel, die von allen Seiten erreichbar sind um später auch Einzelkern-Schale-Partikel zu bilden. Die Synthese entspricht der zur Herstellung von reinen porösen SiO<sub>2</sub>-Partikeln, bis auf die Zugabe der MnO@SiO<sub>2</sub>-Kerne zu Beginn der Synthese. Bevor die Zugabe des TEOS erfolgt sollte eine konstante Reaktionstemperatur erreicht worden und die Homogenisierung der vorgelegten Partikel mit dem CTAB gewährleistet sein.

Abbildung 40 zeigt TEM-Aufnahmen der, über diesen Weg hergestellten  $\text{MnO}@m\text{SiO}_2$ -Partikel. Zur Vereinfachung werden diese Partikel im Folgenden als  $\text{MnO}@m\text{SiO}_2$ -Partikel beschrieben.

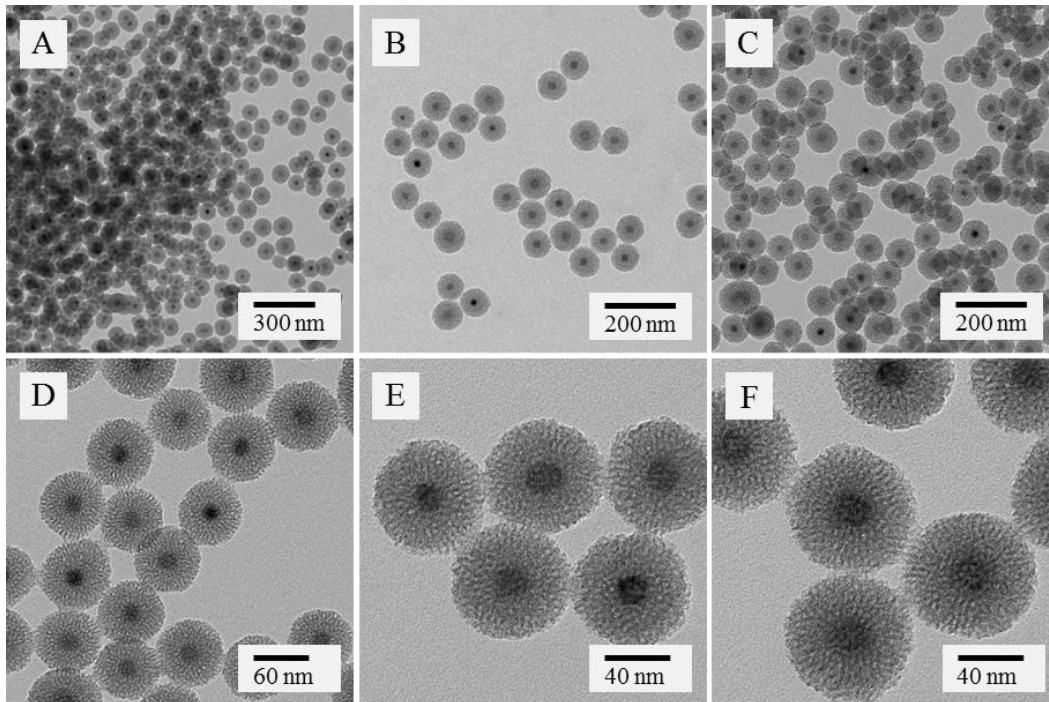


Abbildung 40: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von  $\text{MnO}@m\text{SiO}_2$ -Partikeln.

Eine Größensteuerung der Partikel ist wieder über den pH-Wert der Reaktionslösung möglich. Je mehr Base zur Reaktion dazu gegeben wird, desto größer werden die Partikel, bzw. desto dicker wird die mesoporöse Schale um die Manganoxidkerne. Auch hier gibt es einen kritischen pH-Wert, der allerdings viel niedriger liegt als bei den reinen, nicht porösen Silicananopartikeln. Im nahezu neutralen pH-Wert Bereich können Kern-Schale-Partikel mit einer sehr dünnen Hülle erhalten werden. Im leicht sauren Milieu (pH 5-6) kann sogar eine noch dünnere Hülle erhalten werden, allerdings entstehen auch sehr viele unerwünschte Nebenprodukte wie kleine poröse Partikel ohne Kern oder kleine Netzwerke von porösem Silica.



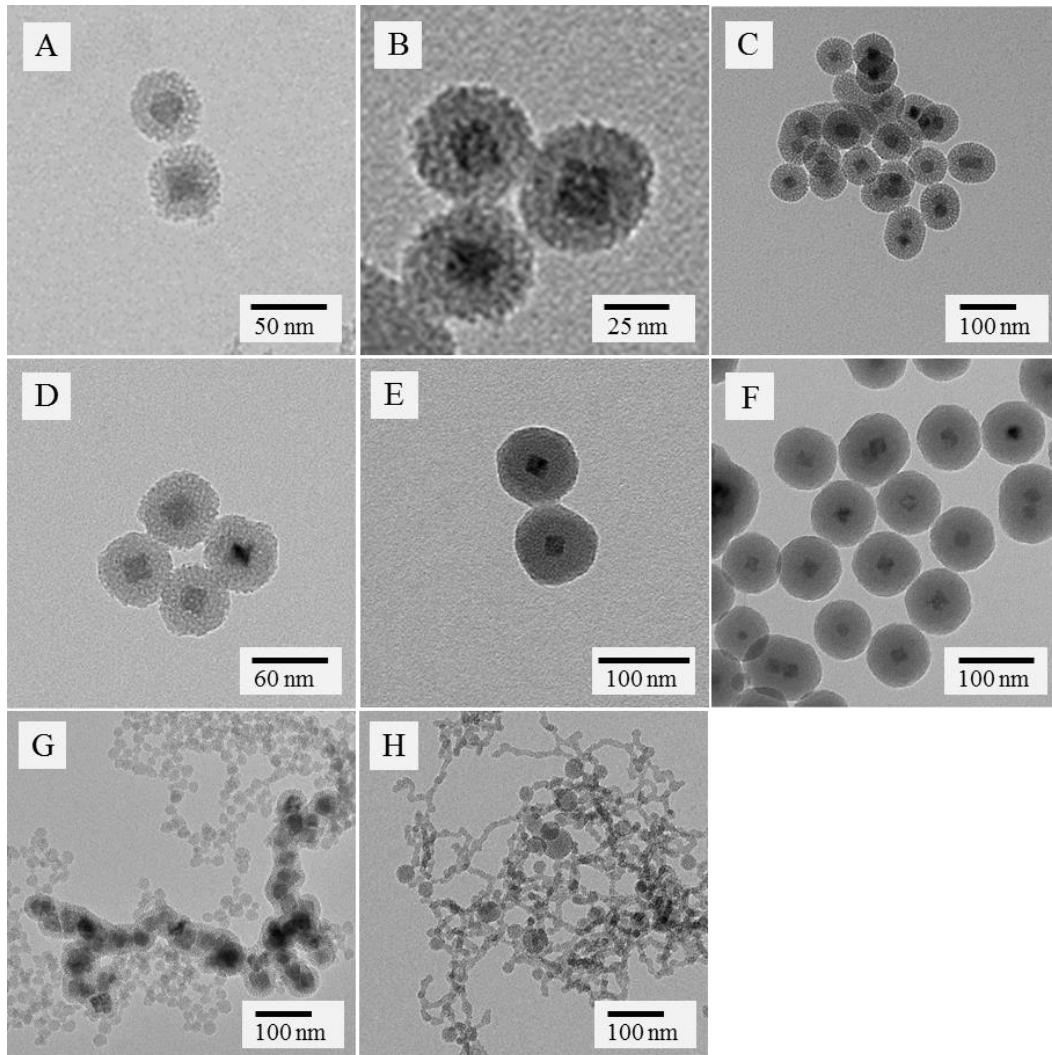


Abbildung 41: A-F: Aufnahmen von MnO@mSi<sub>2</sub>-Kern-Schale-Partikeln mit unterschiedlich dicker poröser Hülle. Von A bis F wird über die pH-Wert Veränderung in der Reaktion die Silicaschicht immer größer (Zugabe von 0,05 – 0,3 mL, 2M Natronlauge). G und H: Einfluss auf die Synthese bei leicht sauren pH-Werten (Zugabe von 0,05 – 0,1 mL Salzsäure).

### **Stabilität der Nanopartikel**

Die Silicahülle dient nicht nur als Speicherkammer für Wirkstoffe oder zur Verbesserung der Löslichkeit in polaren Medien, sondern auch als Schutz für den Metallkern vor äußeren Einwirkungen. Zum Beispiel sind Manganoxidpartikel für längere Zeit beständig ohne sich zu zersetzen und sie sind im Vergleich zu nackten MnO-Partikeln bei geringeren pH-Werten, immer noch stabil. Dies wurde überprüft, indem reine Manganoxidpartikel in Hexan, MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikel und MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikel in Ethanol über einen Zeitraum von 6 Monaten bei Raumtemperatur in gleichen Konzentrationen gerührt wurden. Es wurden zeitliche Proben entnommen, meist monatlich und diese im Elektronenmikroskop betrachtet und in Abbildung 42 zusammengestellt. Bei den reinen MnO-Partikeln kann rasch eine Zersetzung der Nanopartikel festgestellt werden, so dass nach einem Zeitraum von 6 Monaten die Originalpartikel kaum noch zu erkennen sind, es sind lediglich noch Bruchstücke und kleinste Teilchen vorhanden. Die dünne nicht poröse Siliziumdioxidhülle bringt eine deutliche Verbesserung der Stabilität der Partikel mit sich. Nach 3 Monaten sind noch keine Auflösungsprozesse erkennbar, erst später können Agglomeratbildung und Zersetzung beobachtet werden. Bei den MnO@mSiO<sub>2</sub>-Partikeln konnten in dem Zeitraum der Probenahme über die Elektronenmikroskopie keinerlei Veränderung der Partikel festgestellt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen die Partikel komplett unverändert vor (über 1,5 Jahre).

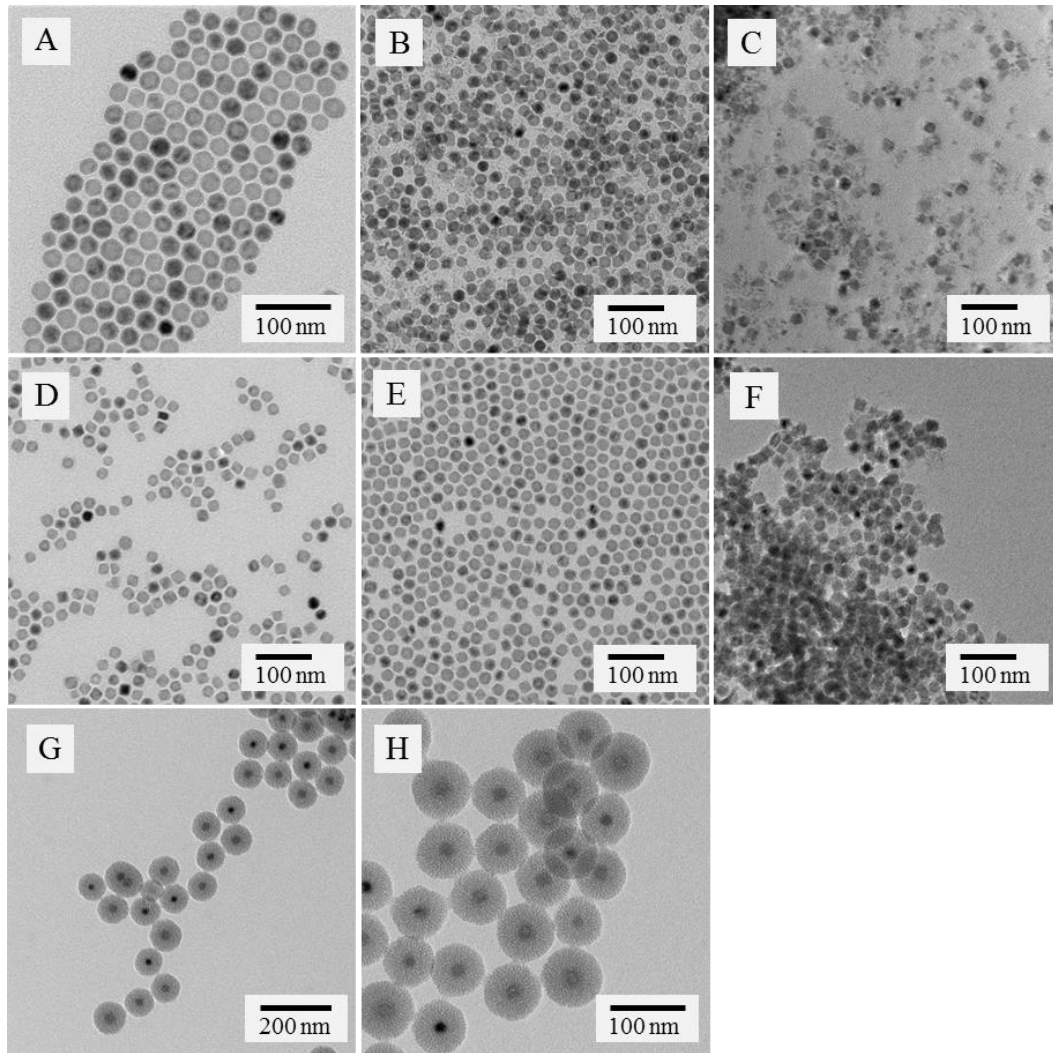


Abbildung 42: Langzeitstabilitätsstudie von MnO-, MnO@SiO<sub>2</sub>- und MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. A, D und G: TEM-Aufnahmen der frisch hergestellten Partikel, B und E: drei Monate gealterte Proben, C und F: sechs Monate gealterte Proben und H: Probe nach einem Jahr.

Auch von den MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurde die Zytotoxizität an dendritischen Zellen bestimmt. Hier wurden zum Vergleich zunächst die MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikel getestet, da von einer toxischen Wirkung des Mn<sup>2+</sup> aus dem MnO ausgegangen wurde. Beide Tests sind in Abbildung 43 abgebildet.

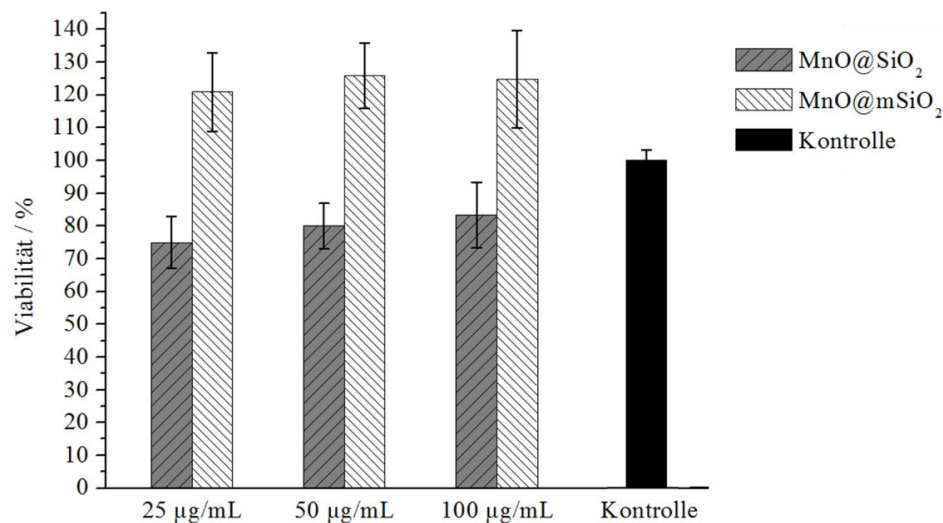


Abbildung 43: Zytotoxizitätstest von MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln und MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln (Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz).

Die MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikel zeigen in den verwendeten Konzentrationsbereichen keinerlei zytotoxische Wirkung, wohingegen bei den MnO@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln schon leichte Absenkungen der Viabilität der Zellen zu beobachten sind. Allerdings werden erst Viabilitäten von unter 60% als toxisch bezeichnet, was hier nicht der Fall ist. Im Vergleich kann aber gesagt werden, dass die mesoporöse Hülle die Partikel besser abschirmt und die Toxizität so herab gesetzt werden kann.

### Funktionalisierung der SiO<sub>2</sub>-Partikel

Für die mesoporösen SiO<sub>2</sub>-Partikel wurde analog zu den SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln aus Kapitel 3.2.2.1 das Zetapotential bestimmt, welches ebenfalls bei  $-8 \pm 2$  mV liegt. Auch nach einer Funktionalisierung mit dem Aminopropylsilan konnten die gleichen Werte von  $10 \pm 2$  mV erreicht werden.

### 3.3.2.2 Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>

Es kann nicht nur eine Kern-Schale-Struktur mit Silica um einfache sphärische Metalloxidpartikel erreicht werden, auch komplexere Strukturen können auf diese Weise umhüllt werden. Wobei genau betrachtet, auch in diesem Fall nur ein sphärisches Manganoxidpartikel eine Silicaschicht erhält. Werden analog zu der Synthese von MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln keine sphärischen MnO-Kerne in der Synthese verwendet, sondern Pt@MnO-Heterodimere, wird nicht das Ganze Heterodimerpartikel umhüllt, sondern lediglich der Manganoxidteil, wohingegen die Platindomäne frei bleibt.

Die Funktionalisierung der größeren Domäne, der Metalloxiddomäne der Partikel, reicht aus um das komplette Partikel stabil in die wässrige Phase zu überführen. Durch die partielle Umhüllung des Partikels stehen immer noch zwei unterschiedliche Oberflächen zur Verfügung um eine orthogonale Funktionalisierung durchzuführen. Es können also Gruppen aufgebracht werden, die verschiedene Anker tragen. Dies kann zum Beispiel eine Überladung eines Stoffs A (z.B. ein Wirkstoff) auf die Partikel verhindern, so dass noch genug von Stoff B (z.B. ein Farbstoff) aufgebracht werden kann. Zusätzlich bringt dies den möglichen Vorteil mit sich, dass zwei verschiedene funktionelle Gruppen räumlich getrennt voneinander auf den Partikeln vorliegen. In Abbildung 44 sind TEM-Aufnahmen und ein Schema von den Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Heterodimeren gezeigt.

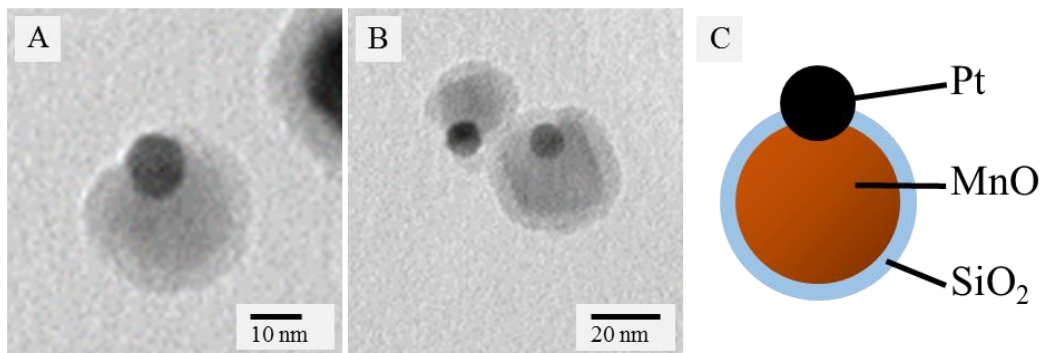


Abbildung 44: A, B: TEM-Aufnahmen von Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln, C: Schematische Darstellung der Heterodimerpartikel.

Bereits hier kann schon erkannt werden, dass die Silicahülle lediglich auf der MnO-Domäne vorhanden ist und nicht auf der Pt-Domäne. Zusätzlich konnte über eine Doppelfunktionali-

sierung mit zwei verschiedenen Farbstoffen gezeigt werden, dass die Pt-Domäne frei zugänglich ist. Hierzu wurden die Partikel zum einen mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), welches an die Aminogruppe eines Thiols (4-ATP) gebunden wurde, umgesetzt und zum anderen wurde Rhodamin(B)-Isothiocyanat (RITC), wie bereits in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben, direkt mit in die Silicahülle eingebaut. Nach der Aufreinigung der Partikel wurde ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung 45 dargestellt ist.

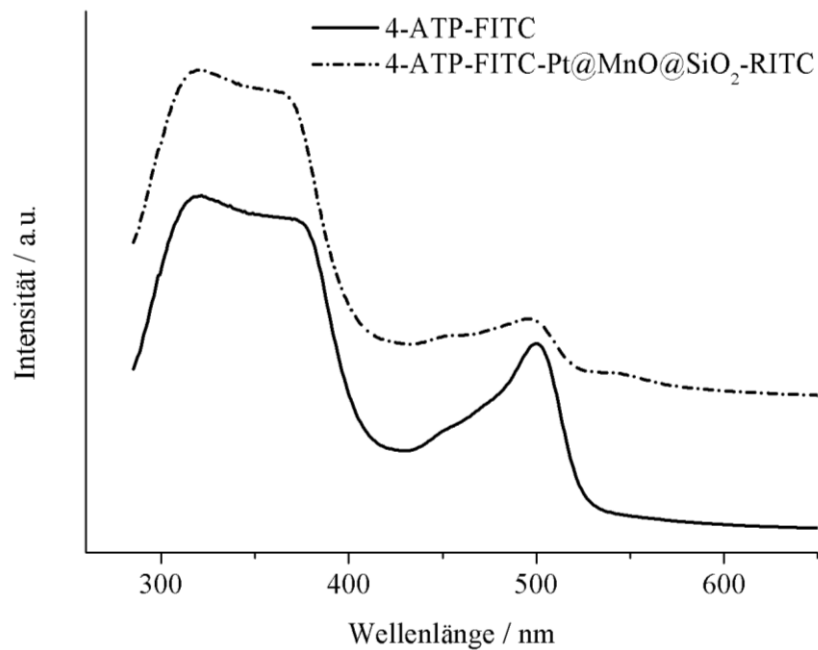


Abbildung 45: UV-Vis-Spektrum der orthogonalen Funktionalisierung von Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

Im UV-Vis-Spektrum ist sowohl die Bande von RITC zu sehen (540 nm), was den Einbau in die Silicahülle bestätigt, als auch die Bande von FITC (495 nm), welches über den Thiolanker lediglich an die Platindomäne binden kann, was zeigt, dass die Platindomäne immer noch frei und zugänglich ist.

### 3.3.2.3 Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>

Die Arbeiten zu diesen Partikeln wurden in Kooperation mit [REDACTED], AK [REDACTED], Universität Mainz durchgeführt und sollen hier kurz vorgestellt werden. Die Au@ZnO-Nanopartikel wurden von [REDACTED], AK [REDACTED], Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Die einseitige Umhüllung einer Oxiddomäne funktioniert nicht nur mit einem klassischen Heterodimer, bei dem die zu umhüllende Domäne eine sphärische Form besitzt, sondern auch bei stark anisotropen Heterodimeren. Dies wurde mit Au@ZnO-Partikeln gezeigt, wobei es sich bei der ZnO-Domäne um Stäbchen handelt. Ähnlich zu Platin wächst auch um das ebenfalls edelmetallische Gold keine Silicahülle, so dass die Golddomäne frei bleibt. In Abbildung 46 D ist die Partikelstruktur schematisch, in Abbildung 46 A und B sind zwei TEM-Aufnahmen dargestellt.

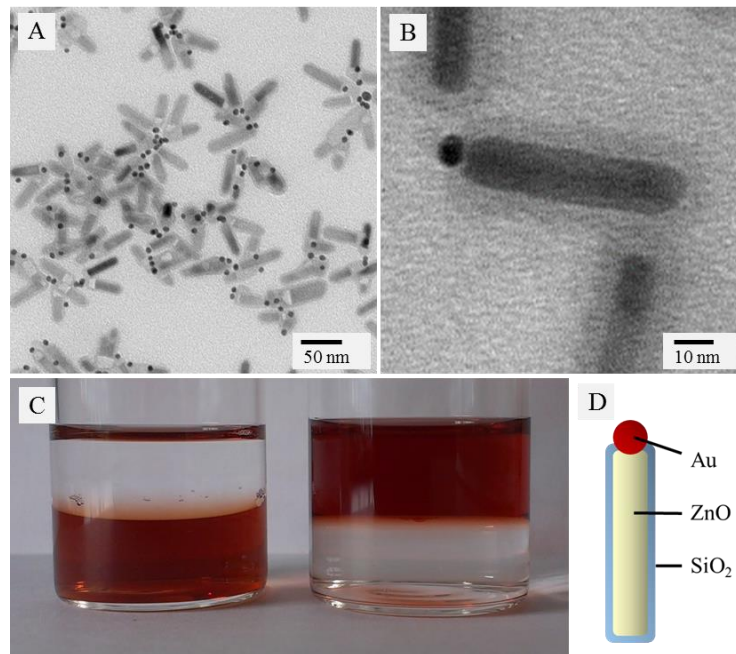


Abbildung 46: A, B: TEM-Aufnahmen von Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln, C: Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>-Partikel in Wasser (links) und Au@ZnO-Partikel in Hexan (rechts), D: Schematische Darstellung der Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>-Heteropartikel.

Die zuvor hydrophoben Partikel sind nach der Funktionalisierung mit Silica im wässrigen löslich, was in Abbildung 46 C gezeigt ist. Auch mit diesen Partikeln konnte analog zu den Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln über eine Doppelfunktionalisierung mit zwei Farbstoffen bewiesen werden, dass die Golddomäne nach der Silicafunktionalisierung immer noch frei und zugänglich ist. Das dazugehörige UV-Vis-Spektrum ist in dem Manuskript „Silica-Coated Au@ZnO Janus Particles and Their Stability in Epithelial Cells“ im Anhang (E.7) gezeigt. Dieses Manuskript zeigt noch weitere Ergebnisse zur Charakterisierung und Anwendung der hier kurz vorgestellten Nanopartikel.

### 3.3.2.4 Pt@SiO<sub>2</sub>

In Kapitel 3.3.2.2 und 3.3.2.3 wurde vorgestellt, wie eine Silicahülle um die Metalloxid-domäne eines Metall@Metalloxid-Heterodimers synthetisiert werden kann. Besonders auffällig bei diesen Partikeln war, dass nur die Metalloxiddomäne von SiO<sub>2</sub> ummantelt wurde und der Metallkopf frei blieb. Dies warf die Frage auf, was passiert, wenn lediglich Metallkerne wie Platin- oder Goldnanopartikel in dieser Synthese verwendet werden. Es wurden somit analog zu der Synthese von MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln und den Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>- bzw. Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>-Heteropartikeln Platinnanopartikel in der reversen Mikroemulsion eingesetzt. Die Platinpartikel wurden nicht von Silica umhüllt, sondern es ist eine SiO<sub>2</sub>-Domäne auf die Platinkerne aufgewachsen, wie in den TEM-Aufnahmen in Abbildung 47 gezeigt ist.

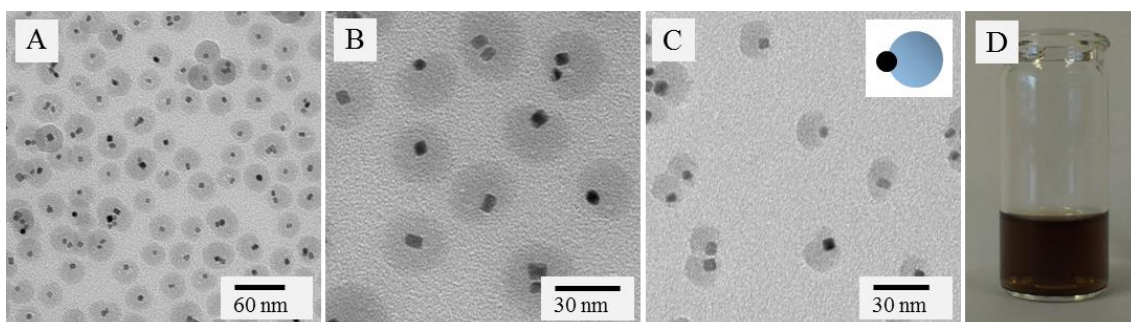


Abbildung 47: Abbildung 18: A-C: TEM-Aufnahmen von Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit unterschiedlich großen Silicadomänen und D: wässrige Lösung von Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikeln.



Dazu soll im Vergleich zu dem Modell für die Oxidpartikel (Kapitel 3.3.1) ein neues Modell vorgeschlagen werden. Der Einbau der Oxidpartikel in die wässrige Phase der Mizelle funktioniert wahrscheinlich so gut, weil deren Oberfläche recht polar ist. Im Vergleich dazu ist die Oberfläche der Platinpartikel eher weniger polar. Diese unpolare Oberfläche der Edelmetallpartikel führt im angenommenen Modell (Abbildung 48) somit dazu, dass die Partikel nicht in die Mizelle eindringen können, sondern in der Mizellenwand „stecken“ bleiben. So kann nur auf einer Seite der Partikel eine SiO<sub>2</sub>-Domäne aufwachsen. Mit Goldnanopartikeln konnten ebenfalls Heterodimere (siehe Anhang E.4) hergestellt werden, allerdings soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

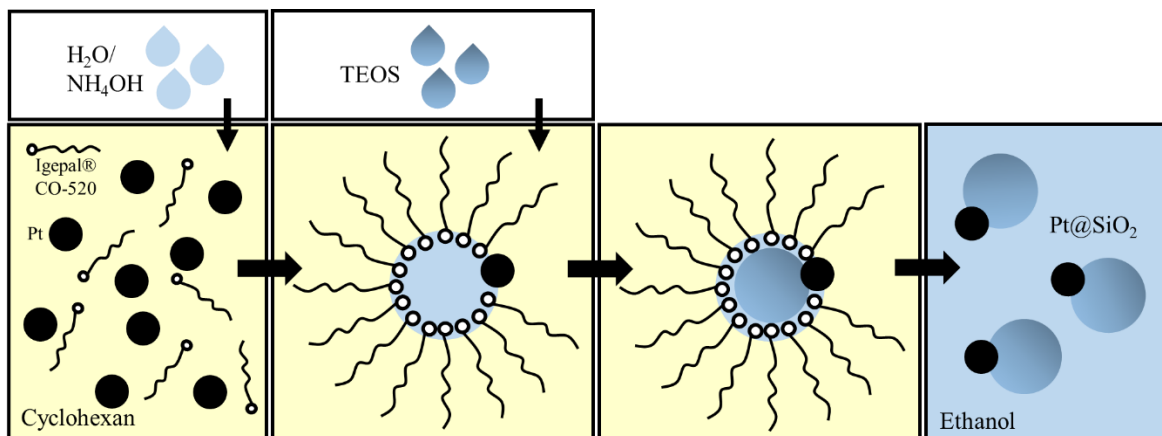


Abbildung 48: Vorgeschlagenes Modell für die Bildung einer Silicadomäne über die reverse Mikroemulsion. Aufgrund niedrigerer Hydrophilie des Platins, bleibt dieses in der Mizellenwand „hängen“ und es bilden sich Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimere.

Diese neuartige Partikelstruktur vereint einen Platinkern mit Siliziumdioxid, womit die Eigenschaften des Platins in wässriger Phase ausgenutzt werden können. Die Silicadomäne mit PEG-TES auf der Oberfläche reicht aus, um den gesamten Partikel für lange Zeit stabil in Wasser oder anderen polaren Lösungsmitteln zu lösen. Zusätzlich kann hier genau wie bei den anderen Heterodimern die orthogonale Funktionalisierbarkeit ausgenutzt werden, die hier ebenfalls mit den beiden Farbstoffen FITC und RITC bewiesen wurde. In Abbildung 49 ist das UV-Vis-Spektrum dargestellt, welches die Banden beider an die Partikel gebundenen Farbstoffe zeigt. Zum einen die rote Bande von dem in die Silicahülle eingebauten Farbstoff

RITC bei ca. 540 nm und zum anderen die grüne Bande, von dem über das Thiol, 4-Aminothiophenol gekoppelte FITC an die Platindomäne, bei ca. 495 nm.

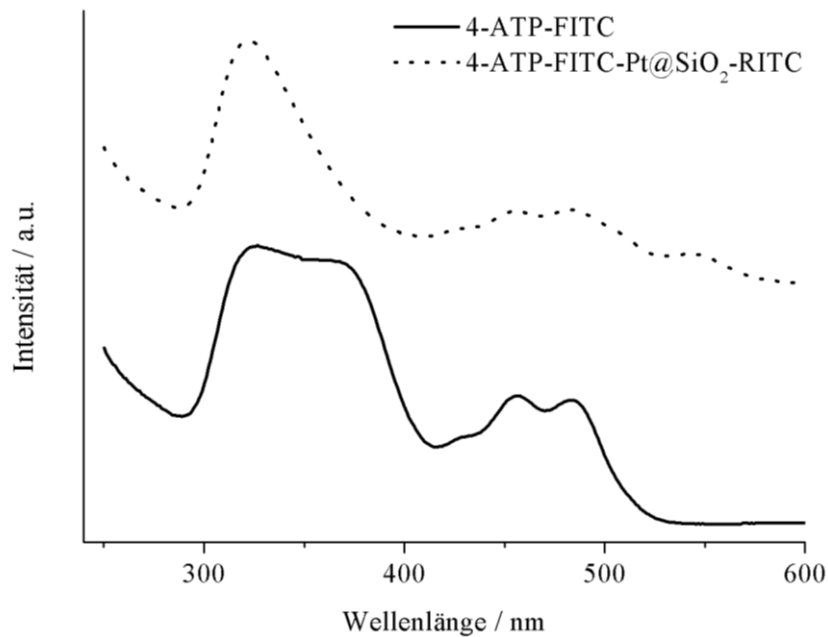


Abbildung 49: UV-Vis-Spektrum der orthogonalen Funktionalisierung von Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

Der Platinkern in diesem System soll hauptsächlich der Röntgenstrahlabschwächung dienen, um die Partikel als Kontrastmittel in der Computertomographie nutzen zu können. Dazu wurde von den Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimeren in Wasser, in verschiedenen Konzentrationen, die Röntgenstrahlabschwächung in Hounsfield Units gemessen. Im Vergleich dazu wurden die in Abbildung 50 dargestellten, kommerziell erhältlichen Kontrastmittel Imeron<sup>®</sup> [83] und Ultravist<sup>®</sup>, [84] die in der Computertomographie eingesetzt werden, gemessen.

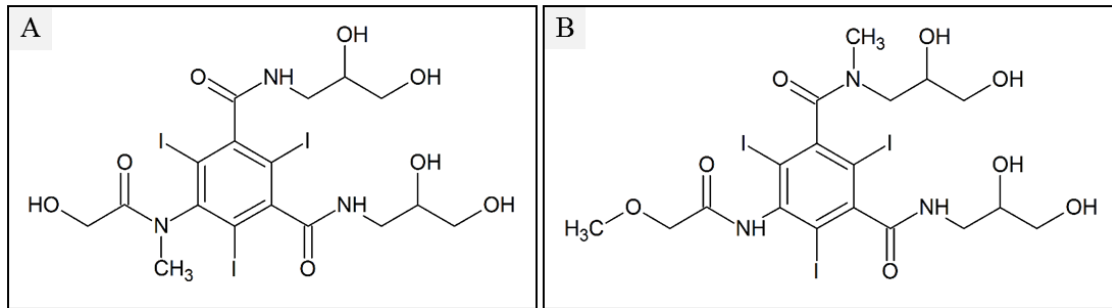


Abbildung 50: Strukturformeln von A: Imeron<sup>®</sup> und B: Ultravist<sup>®</sup>.

Die so erhaltenen Daten wurden in Abbildung 51 in einem Diagramm zusammengefasst. Die aufgetragenen Konzentrationen entsprechen der Platinpartikelkonzentration in dem System „Pt@SiO<sub>2</sub>“ und nicht der Gesamtpartikelkonzentration. In einem Konzentrationsbereich von 0,25 bis 4 mg Platin konnten Werte im Bereich von 40 bis zu 700 H.U. erreicht werden.

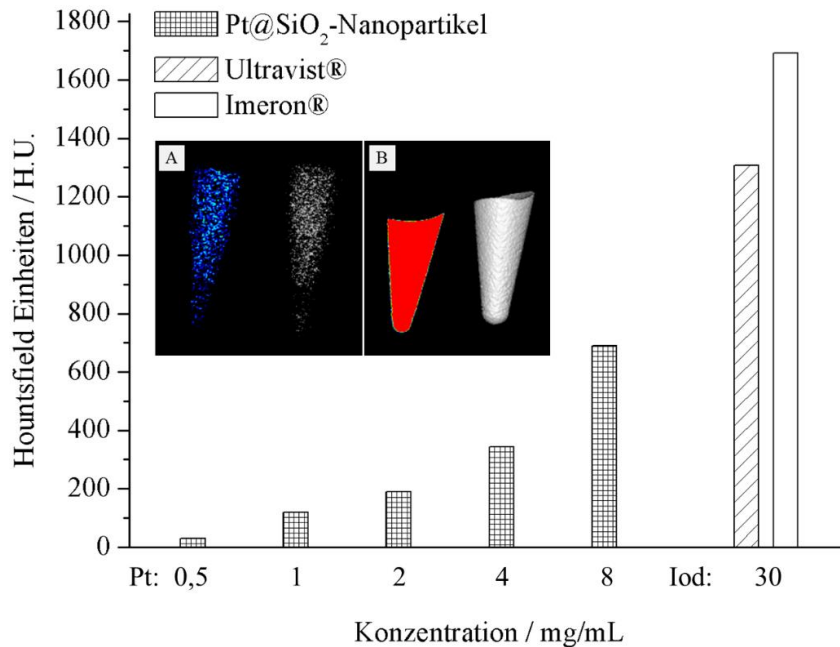


Abbildung 51: Röntgenabschwächung in Hounsfield Units von Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimeren, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Kontrastmitteln. Aufgetragen sind die H.U.-Werte der Partikel bei verschiedenen Platinkonzentrationen und die der Kontrastmittel Ultravist<sup>®</sup> und Imeron<sup>®</sup> bei einer Iodkonzentration. A, B: 3D-Aufnahme des Röntgenkontrastes von A: reinem Wasser (dest.) und B: Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln in Wasser.

Die Kontrastmittel Imeron<sup>®</sup> und Ultravist<sup>®</sup> erreichen hier zwar deutlich höhere H.U.-Werte, allerdings wurde hier auch eine deutlich höhere Konzentration von 30 mg/mL eingesetzt. Bei diesen Kontrastmitteln bezieht sich die Konzentrationsangabe auf den Anteil an Iod in der Substanz. Die Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel erreichen also in einem wässrigen System gute Werte für die Röntgenabschwächung <sup>[12], [13]</sup>, wobei diese Werte und Konzentrationen natürlich in Korrelation mit der Verträglichkeit der Nanopartikel gestellt werden müssen. Dazu wurden Zytotoxizitätsstudien mit den Partikeln an dendritischen Zellen (DC) durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 52 dargestellt ist. Die verwendeten Partikelkonzentrationen in den Zytotoxizitätstest wurden zunächst den „Standardkonzentrationen“ in solchen Tests angepasst.

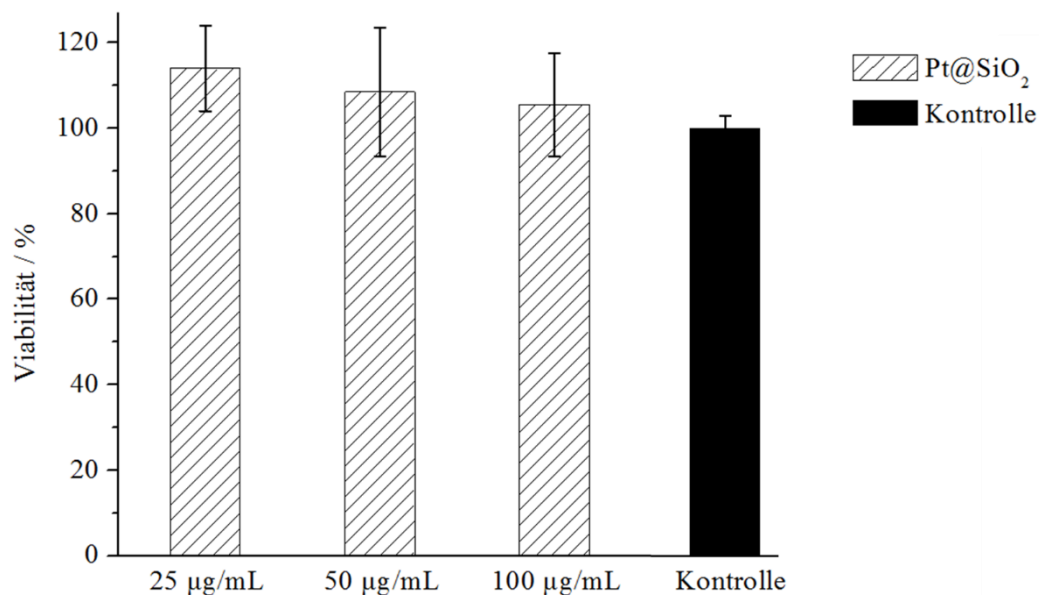


Abbildung 52: Viabilität von dendritischen Zellen in Gegenwart von Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen nach 24 h Inkubationszeit. Bestimmung mit Hilfe eines Zytotoxizitätstest (Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz).

Zu sehen ist, dass bei allen getesteten Konzentrationen die Viabilität der Zellen etwas über 100% liegt, was zeigt, dass in diesem Rahmen die Nanopartikel keinerlei Einfluss auf die Viabilität der Zellen besitzen. In der Literatur wird teilweise eine toxische Wirkung von

Platinanopartikeln postuliert, <sup>[85]</sup> weshalb hier ein Modell vorgeschlagen werden soll (Abbildung 53), welches die nicht vorhandene Toxizität der hier vorgestellten Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikel erklären soll.

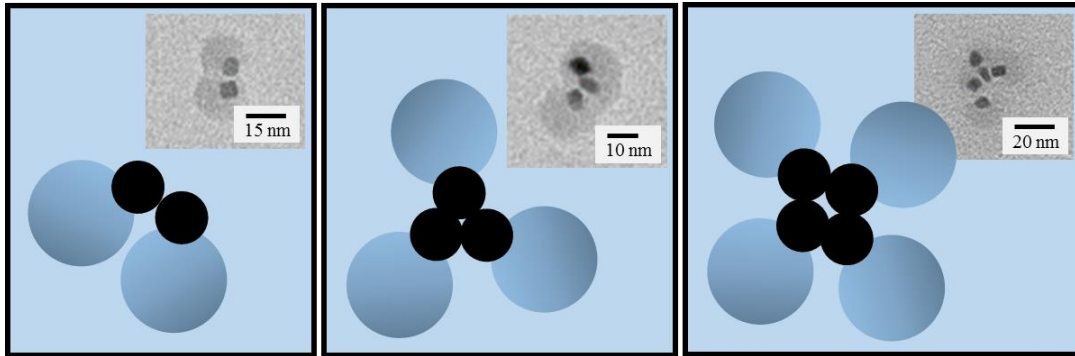


Abbildung 53: Modell zur Zusammenlagerung von Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikeln in wässriger Lösung.

Wie bereits beschrieben, sorgt lediglich die Silicadomäne für die Wasserlöslichkeit der Partikel, da auf der Platinseite keine weitere Funktionalisierung zur Hydrophilisierung stattgefunden hat. Die Platindomäne ist somit nahezu ligandenfrei, bis auf wenige Oleylaminliganden, die noch auf der Oberfläche verblieben sind und nicht ganz entfernt werden konnten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Partikel sich in wässriger Lösung mit der Platindomäne zusammen lagern, was in Abbildung 53 schematisch dargestellt wurde und auch in TEM-Aufnahmen beobachtet werden konnte. Aufgrund dieser Vermutung wurden die Partikel mit Hilfe der Lichtstreuung untersucht (siehe Abbildung 54). Hierbei konnte ein hydrodynamischer Durchmesser von rund  $50 \pm 10$  nm ermittelt werden. Bei Betrachtung der TEM-Aufnahmen in Abbildung 53 können die Partikeldurchmesser so addiert werden, dass in allen drei Konstellationen ein Gesamtdurchmesser von 40 – 50 nm erreicht wird. Das angenommene Modell kann also mit den Daten des hydrodynamischen Durchmessers unterstützt werden.

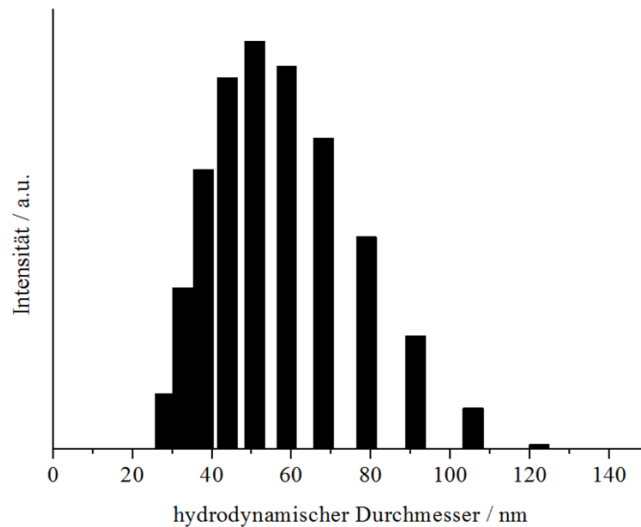
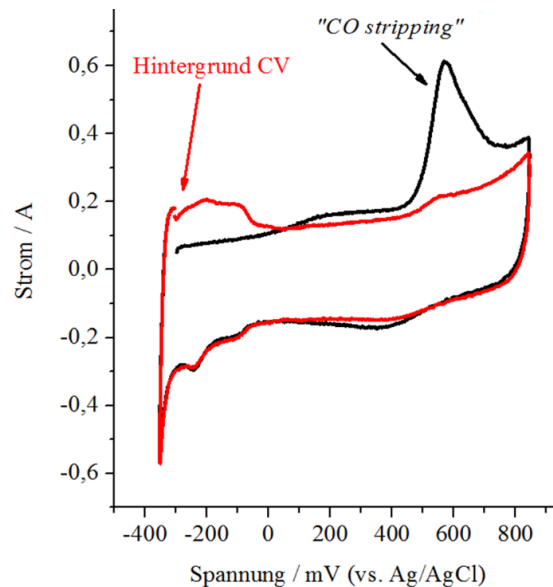


Abbildung 54: Hydrodynamischer Durchmesser von Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikeln in Wasser.

Platinanopartikel sind ebenfalls für ihre Katalyseaktivität bekannt,<sup>[86]</sup> weshalb die hier hergestellten Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikel dahingehend untersucht wurden. Die (elektro-)katalytische Aktivität der Nanopartikel wurde daher von Eva Morsbach (AG Bäumer, Universität Bremen, in Kooperation mit AG Arenz, Universität Kopenhagen) mit Hilfe der Cyclovoltametrie untersucht. Hierbei wird die Arbeitselektrode mit der zu untersuchenden Probe (hier: Pt@SiO<sub>2</sub>) einer Dreiecksspannung ausgesetzt. Durch einen Drei-Elektroden-Aufbau kann das angelegte Potential zwischen Arbeits- und Gegenelektrode über die Referenzelektrode (Elektrode 2. Art) genau bestimmt werden. Bei charakteristischen Potentialen finden bestimmte Elektrodenreaktionen statt, z.B. Oxidation bzw. Reduktion des Pt oder Adsorption bzw. Desorption von Adsorbaten (z.B. aus dem Elektrolyten), so dass sich in Abhängigkeit von der Spannung der Verlauf der Stromstärke ändert. Findet nun eine Elektrodenreaktion am Platin statt, kann bei der charakteristischen Spannung eine Stromspitze beobachtet werden. Durch Integration der Stromspitzen kann die stattgefundene Reaktion quantifiziert und damit der Anteil der katalytisch aktiven Platinatome an der Oberfläche der Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikel bestimmt werden. In Abbildung 55 ist das gemessene Cyclovoltogramm der Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel dargestellt.

Abbildung 55: Cyclovoltogramm von Pt@SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

In einer einfachen cyclovoltametrischen Messung konnte gezeigt werden, dass eine Wasserstoff-Adsorption bzw. -Desorption und eine Platin-Oxidation bzw. -Reduktion stattgefunden hat (siehe Abbildung 55, „Hintergrund CV“). Diese Signale zeigen, dass die Nanopartikel freie Platinoberflächenatome besitzen. Des Weiteren wurde das sogenannte „CO stripping“ durchgeführt, wobei Kohlenmonoxid an die freie Platinoberfläche adsorbiert und anschließend bei dem entsprechenden Potential (400-700 mV vs. Ag/AgCl forward scan) zu CO<sub>2</sub> oxidiert und damit einhergehend desorbiert wird, (Abbildung 48, „CO stripping“).

Die integrierte Fläche dieser Signale ist proportional zur elektrochemischen Oberfläche (ECSA, engl.: *electrochemical surface area*). Über das „CO stripping“ ist eine genauere Bestimmung der aktiven Oberfläche möglich. So konnte eine elektrochemische Oberfläche von  $37 \pm 4 \text{ m}^2/\text{g}$  der Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikel bestimmt werden. Dieser Wert kann mit der theoretisch aktiven Oberfläche der Partikel verglichen werden, der wie folgt bestimmt wurde: Die Kantenlänge der verwendeten Platinwürfel betrug ca. 7 nm, so konnte eine geometrische Oberfläche von 294 nm<sup>2</sup> berechnet werden. Über den Radius und die Atommasse eines Platinatoms, sowie die Raumerfüllung eines *fcc*-Kristalls kann die ungefähre Masse eines Platinpartikels bestimmt werden ( $m_{(\text{Pt-NP})} = 7,8 \cdot 10^{-18} \text{ g}$ ).

Wird nun die Partikeloberfläche durch die Partikelmasse geteilt, wird eine geometrische Oberfläche von 37,56 m<sup>2</sup>/g erhalten. Zur besseren Veranschaulichung kann der Wert auf die vorhandenen Oberflächenatome bezogen werden. Bei den eingesetzten Nanopartikeln befinden sich 21% der Platinatome auf der Oberfläche der Platinpartikel. Das bedeutet, dass 99% aller Oberflächenatome katalytisch aktiv sind.

### 3.3.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass verschiedene Metall- und Metalloxidnanopartikel mit Siliziumdioxid kombiniert werden können. Es konnten sowohl sphärische, als auch anisotrope Partikel mit einer Silicahülle ummantelt werden, die dann für die verschiedensten Zwecke zum Einsatz kommen können. Die hier hergestellten Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikel wurden zum Beispiel über die Thiolgruppe eines Cystein-markierten Proteins funktionalisiert (██████████, AK ██████████). In Kombination mit den Partikeleigenschaften ist somit ein Einsatz in der Biomimetik denkbar. Des Weiteren wurde die Struktur von Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimerpartikeln vorgestellt werden, die aufgrund ihrer geringen Zytotoxizität möglichen orthogonalen Funktionalisierbarkeit, gute Wasserlöslichkeit und den Einsatz als Röntgenkontrastmittel ein hohes Potential zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie aufweisen. Für diese Partikel ist zunächst eine Überprüfung der Zytotoxizität für höhere Konzentrationen, vergleichbar mit den eingesetzten Konzentrationen für die computertomographischen Messungen, wichtig. Da ein potentieller Einsatz der Partikel in den Konzentrationsbereichen erfolgen muss, in denen ein hoher Röntgenkontrast erreicht wird, müssen die Partikel auch in diesen Bereichen untoxisch sein.



# Kapitel 4

## Direkte und Indirekte Tumorabwehr mit SiO<sub>2</sub>-Partikeln

### 4.1 Einführung und Theorie

In Kooperation mit der AG [REDACTED], Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz sollte gezeigt werden, dass mit TNF $\alpha$  funktionalisierten Silicananopartikeln das Tumorwachstum bei Mäusen supprimiert werden kann. Hinzukommend war es das Ziel SiO<sub>2</sub>-Partikel auch mit einem weiteren Zytokin, dem IL-2 sowie einer siRNA zu modifizieren, um in späteren Versuchen regulatorische T-Zellen adressieren zu können. Hierzu wurden die Kopplungsexperimente der Substanzen, die Bioaktivitätsversuche (*in vitro*) und die Mausstudien in Zusammenarbeit mit [REDACTED], AG [REDACTED] durchgeführt.

## 4.1.1 Grundlagen

### 4.1.1.1 Direkte Tumorabwehr mit Hilfe des Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (engl.: *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) ist ein Zytokin des Immunsystems, genauer des angeborenen Immunsystems (siehe Kapitel 2), welches zusammen mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln als Tumorabwehrsystem eingesetzt werden soll. Zytokine sind kleine Proteine (bis ca. 25kDa) die von verschiedenen Zellen als eine Reaktion auf einen bestimmten Reiz, wie zum Beispiel eine Entzündung, ausgeschüttet werden.

TNF $\alpha$  liegt als Homotrimer vor, dessen Primärstruktur aus einem  $\beta$ -Faltblatt, bestehend aus 157 Aminosäuren, mit einer Masse von 17,4 kDa, zusammengesetzt ist. In Abbildung 56 ist die dreidimensionale Struktur des Trimers und ein Schema zum Aufbau des Monomers dargestellt. [87]. [88]

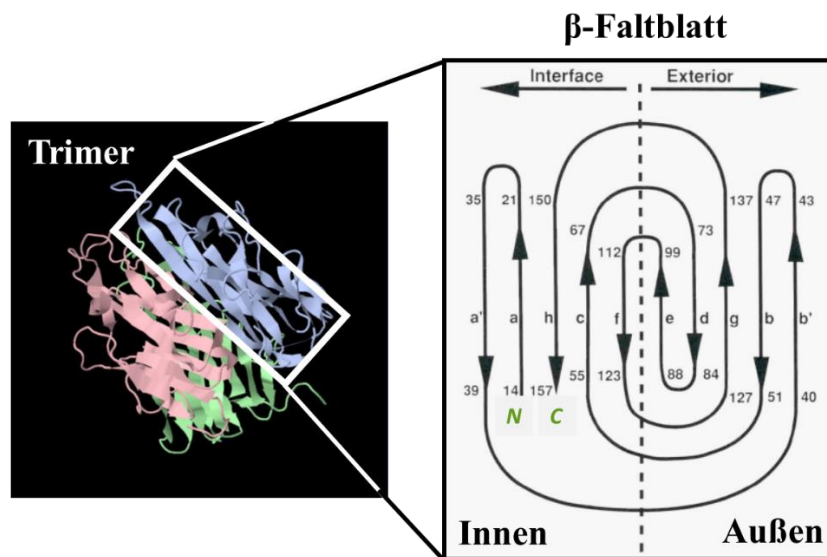


Abbildung 56: 3D-Struktur eines TNF $\alpha$ -Trimers<sup>[89]</sup> (links) und schematische Darstellung des Aufbaus eines TNF $\alpha$ -Monomers.

Im Körper wird TNF $\alpha$  hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und dient dazu die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln. Hierzu kann es an alle Rezeptoren der TNFR-

Familie binden, um so bestimmte Reaktionen in der Zelle auszulösen. So ist  $\text{TNF}\alpha$  in der Lage, allein durch seine Bindung und ohne eine Internalisierung, die Apoptose einer Zelle zu induzieren. Aus diesem Grund werden die TNF-Rezeptoren auch als Todesrezeptoren bezeichnet, deren „Todesdomäne“ (DD, engl.: *death domain*) sich im zytoplasmatischen Teil der Zelle befindet. Nach einer Trimerisierung des Rezeptors erfolgt eine Signalkaskade in der Zelle, an deren Ende die Induktion des programmierten Zelltodes steht (siehe Abbildung 57). Durch eine Anreicherung dieses Zytokins im Tumorgewebe, soll die Apoptose der malignen Zellen ausgelöst und so der Tumor bekämpft werden.  $\text{TNF}\alpha$  ist jedoch nicht nur in der Lage, die Apoptose einzuleiten, sondern es kann auch eine lokale Entzündungsreaktion auslösen, wodurch körpereigene Immunzellen angelockt werden und das maligne Gewebe bekämpfen können.

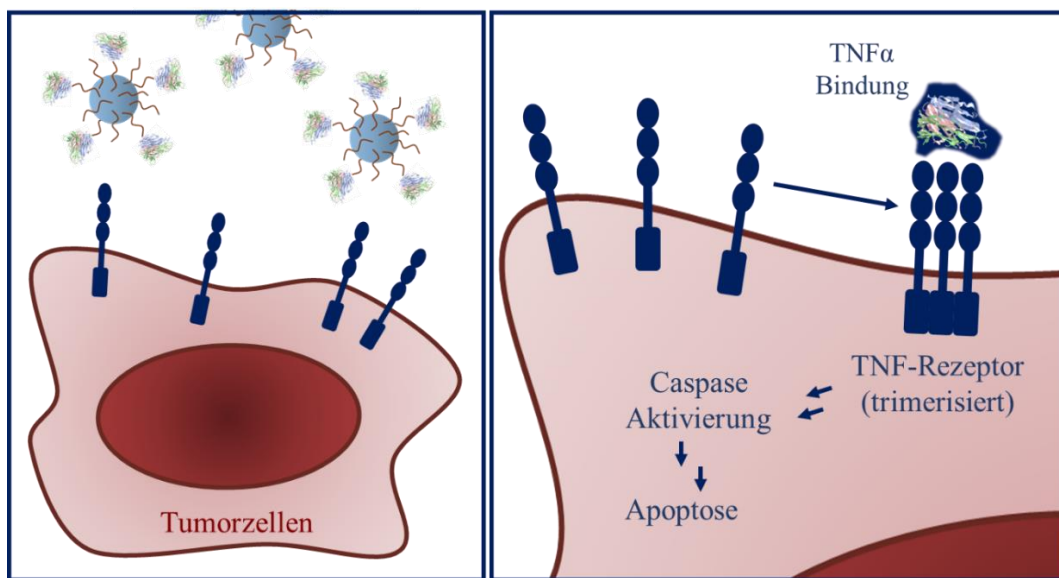


Abbildung 57: Schematische Darstellung der  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor Bindung und der ausgelösten Signalkaskade.

Der Wirkstoff  $\text{TNF}\alpha$ , auch bekannt als Tasonermin, kommt bereits in der Medizin zur Bekämpfung von Tumoren zum Einsatz. Hier wird er zum Beispiel in Form von einer Infusionslösung wie Beromun<sup>®</sup> zur Behandlung von Weichteilsarkomen (Geschwulsttumor) der Arme und Beine eingesetzt. Oftmals führt dies lediglich zu einer Reduktion der Tumorgöße, was dann allerdings eine operative Entfernung des Tumors erleichtert oder eine

schwere Schädigung des gesunden, umgebenden Gewebes verhütet. Die Maßnahmen können helfen eine Amputation der Gliedmaßen zu vermeiden.<sup>[90]</sup>

Die Behandlung erfolgt an isolierten Gliedmaßen, welche extern über eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) versorgt werden, damit kein TNF $\alpha$  in den restlichen Körper gelangen kann. Dies ist nötig, da eine systemische Leckage zu bedrohlichen Nebenwirkungen führen kann. Eine Freisetzung von TNF $\alpha$  kann unter anderem zu einer Gefäßerweiterung führen, was dann, aufgrund der erhöhten Permeabilität, zu einem Verlust von Blutplasma führen kann, es erfolgt ein Schock. Es kann aber auch zu einer intravaskulären Blutgerinnung kommen, wodurch Gerinnungsproteine aufgebraucht werden und keine angemessene Blutgerinnung mehr möglich ist. Dies führt letzten Endes alles zu einem Ausfall von lebenswichtigen Organen, wie Herz, Leber, Lunge oder Nieren. TNF $\alpha$  hat also, bei einer gezielten und lokalen Freisetzung sehr positive Eigenschaften, bei einem systemischen Auftreten im ganzen Körper jedoch sehr negative. Aus diesem Grund ist es erstrebenswert eine Maßnahme zu etablieren in der TNF $\alpha$  in einer Form verabreicht werden kann, die lediglich das krankhafte maligne Gewebe betrifft und nicht zusätzlich auf gesundes Gewebe schlägt.

#### **4.1.1.2 Indirekte Tumorabwehr mit Hilfe von Interleukin-2**

T-Lymphozyten (T-Zellen) sind Zellen die der Immunabwehr dienen und bilden zusammen mit den B-Lymphozyten den Hauptbestandteil der adaptiven Immunität. Es handelt sich um Blutzellen, welche im Knochenmark gebildet werden und im Thymus ausreifen, wohingegen die B-Zellen auch im Knochenmark ausreifen (*bone marrow derived cells*). Beide Zelltypen unterschieden sich somit durch ihren Ausreifungsort und durch ihre Antigenrezeptoren. B-Zellen können nach dem Kontakt mit einem Antigen dann z.B. zu Plasmazellen differenzieren (siehe Kapitel 2) und antigenspezifische Antikörper produzieren, wohingegen T-Zellen sich zu T-Effektorzellen entwickeln können und dann ebenfalls zur Beseitigung des Antigens beitragen.

Regulatorische T-Zellen haben die Funktion, solch eine Immunreaktion herunter zu regulieren und dadurch die Immuntoleranz zu kontrollieren. Sie können also, wenn nötig die Aktivierung

und das Wachstum von T-Zellen unterbinden. Dies ist sehr wichtig, da es nicht passieren darf, dass körpereigenes Gewebe als fremd erkannt wird (Autoimmunreaktion).

Tumorgewebe exprimiert jedoch oftmals körpereigene Antigene auf seiner Oberfläche und wird dadurch nicht vom Immunsystem, genauer den T-Zellen erkannt. Zudem werden auch Botenstoffe ausgesendet, um eine erhöhte Zahl von regulatorischen T-Zellen im Tumormilieu anzusammeln, die dann zu einer Runterregulation bzw. Inhibition der T-Zellen führt (siehe Abbildung 58).

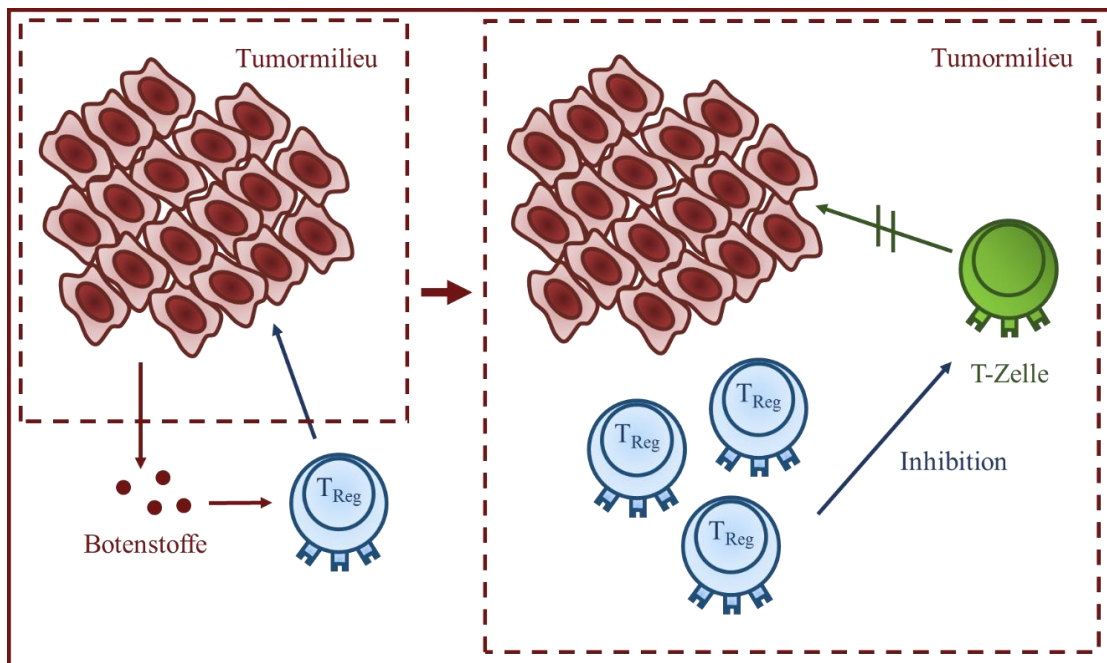


Abbildung 58: Schematische Darstellung der T-Zell-Inhibition durch regulatorische T-Zellen.

Aus diesem Grund sollen die regulatorischen T-Zellen im Tumormilieu supprimiert werden um eine erhöhte Unterdrückung der T-Zell-Proliferation zu unterbinden. Dies soll dazu führen, dass die T-Zellen die Möglichkeit haben, das maligne Gewebe zu erkennen und zu bekämpfen. Um lediglich das Wachstum der T<sub>Reg</sub>-Zellen zu hemmen, müssen diese bevorzugt angesteuert werden. Hierzu kann die erhöhte Expression des IL-2-Rezeptors auf deren Oberfläche ausgenutzt werden.

IL-2 ist ein Zytokin aus der Familie der Interleukine und ist auch unter dem Namen TCGF (engl.: *T-cell growth factor*) bekannt. Es liegt als Monomer, zusammengesetzt aus 133 Aminosäuren, mit einer Masse von 15,4 kDa vor.

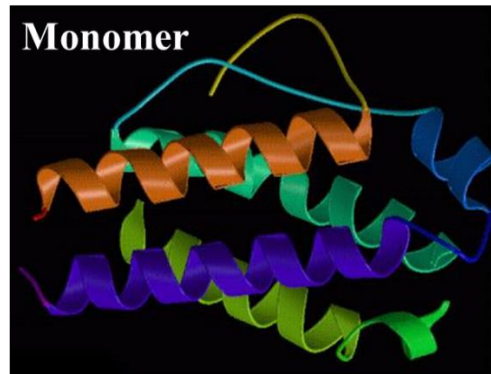


Abbildung 59: 3D-Struktur eines Interleukin-2. <sup>[91], [89]</sup>

Es handelt sich also um einen T-Zell-Wachstumsfaktor und ist essentiell für die Proliferation von T-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>). Beide Zelltypen exprimieren den IL-2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, wobei dieser bei naiven T-Zellen erst nach einer Aktivierung zu finden ist. Dies bedeutet, dass T<sub>Reg</sub>-Zellen einen höher affinen IL-2-Rezeptor exprimieren, mit dem sie über die  $\alpha$ -Kette (CD25) IL-2 binden können. Es soll also eine Ansteuerung von regulatorischen T-Zellen mit Hilfe von Interleukin-2 durchgeführt werden. Durch die Bindung von IL-2 an den CD25+ Rezeptor würde es allerdings zu einer Proliferation der Zellen kommen, weshalb zusätzlich ein Inhibitor in die Zelle eingebracht werden muss.

Solch ein Inhibitor kann eine siRNA (engl.: *small interfering RNA*, *kurzer RNA-Doppelstrang*) gegen den Transkriptionsfaktor FoxP3 (engl.: *Forkhead-Box-Protein P3*, stimuliert die Expression von, für T<sub>Reg</sub>-Zellen essentiellen, Proteinen) sein, den ausschließlich regulatorische T-Zellen besitzen. Durch die Runterregulation des Fox-Proteins 3 können die T<sub>Reg</sub>-Zellen somit ausgeschaltet werden. Folglich sollten die T-Zellen mittels dem nun verfügbaren IL-2 in der Peripherie in der Lage sein proliferieren zu können. Ohne eine Inhibition der T<sub>Reg</sub>-Zellen würden diese das IL-2 aus dem extrazellulären Milieu entziehen und so zusätzlich das Wachstum der T-Zellen inhibieren.

### 4.1.1.3 ELISA

Hierbei handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (engl.: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), mit dem unter anderem Proteine und Viren nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Sandwich-ELISA die Proteine TNF $\alpha$  und IL-2 nachgewiesen. Bei einem Sandwich-ELISA, in Abbildung 60 dargestellt, werden spezifische Antikörper für das nachzuweisende Protein (Antigen) auf einen Träger, zum Beispiel eine Mikrotiterplatte gebunden. Danach wird die Probe auf die Platte gegeben und das eventuell vorhandene Antigen bindet an die Antikörper. Nach einem Waschschrift wird ein zweiter Antikörper auf die Platte gegeben, der im Vergleich zu dem ersten ein anderes Epitop des Antigens erkennt und somit auf die andere Seite binden kann. Nur da, wo zuvor das Antigen gebunden hat, befindet sich nun der zweite Antikörper, der Detektionsantikörper. Dieser Detektionsantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches mit einem Farbsubstrat reagieren kann, das in einem letzten Schritt auf die Mikrotiterplatte aufgetragen wird.

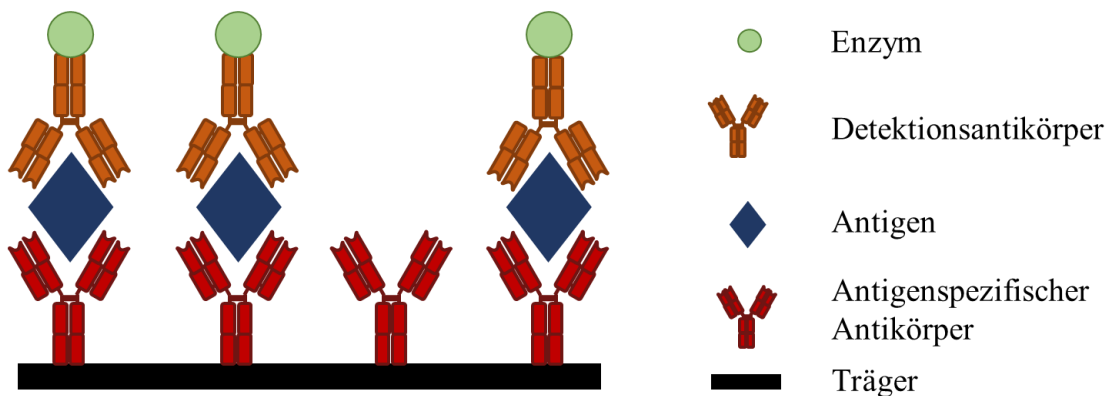


Abbildung 60: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.

Je mehr Detektionsantikörper also gebunden hat, desto mehr Enzym ist vorhanden um mit dem Substrat zu reagieren. Anhand der Farbreaktion, kann mit Hilfe einer ebenfalls aufgetragenen Verdünnungsreihe des Antigens, die Konzentration des Antigens in den Proben photometrisch bestimmt werden. In einem einfachen ELISA wird das Antigen selbst auf einen Träger adsorbiert und der spezifische enzymgekoppelte Detektionsantikörper direkt auf die Probe gegeben.

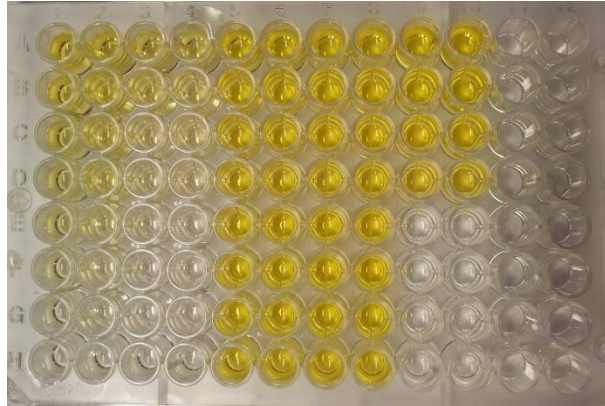


Abbildung 61: ELISA-Platte (96-well-Platte) eines Sandwich-ELISA, nach der Zugabe von Schwefelsäure (Reaktionsstopp). So kann die Platte in einem *Platereader* ausgelesen werden. In den ersten beiden Spalten ist eine Verdünnungsreihe von TNF $\alpha$  aufgetragen, alle anderen Spalten enthalten verschiedene Proben. Die Spalten ganz rechts sind leer.

#### 4.1.1.4 Kopplungsmechanismus für die Bindung der Zytokine an die SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Die Bindung von TNF $\alpha$  und IL-2 an die Aminogruppen der Nanopartikel erfolgt über eine EDC/NHS-Kopplung. Dabei findet zunächst eine Aktivierung der freien Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Proteine statt, welche aus den vorhandenen sauren Aminosäuren zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 62).

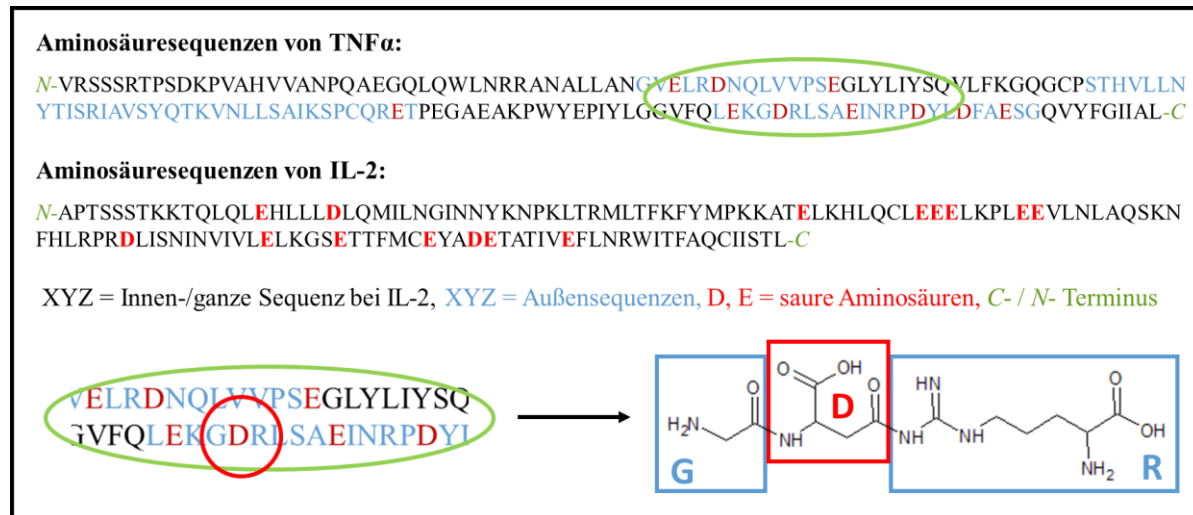


Abbildung 62: Aminosäuresequenzen von TNF $\alpha$  und IL-2. <sup>[91]</sup>



Das Aktivierungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) kann an die vorhandenen Säuregruppen der Proteine binden und sie für die darauf folgende Bindung von N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktivieren. Die gebildeten NHS-Ester stellen aktivierte Carbonsäuren dar, die jetzt sehr leicht unter Bildung einer Amidbindung mit Aminogruppen reagieren können. In Abbildung 63 ist dieser Kopplungsmechanismus für die Bindung eines TNF $\alpha$ -Moleküls an ein Silicananopartikel schematisch dargestellt. Für die Bindung des IL-2-Moleküls ist der Mechanismus analog.

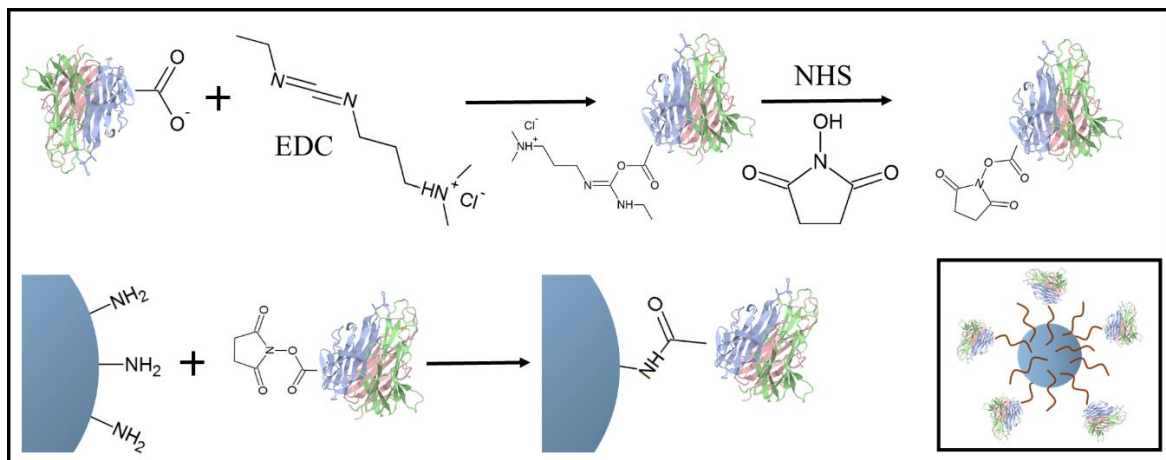


Abbildung 63: Mechanismus der EDC/NHS-Kopplung für die Bindung der Proteine an die Silicananopartikel.

#### 4.1.1.5 Aufgabe

Es sollen Silicananopartikel mit TNF $\alpha$  gekoppelt werden, um eine direkte Tumorabwehr zu injizieren. Durch die Bindung von TNF $\alpha$  an einen der TNF-Rezeptoren soll die Apoptose der malignen Zellen eingeleitet werden. Dazu soll zunächst die Bioaktivität der modifizierten Partikel *in vitro* und *in vivo* getestet werden, ohne eine spezifische Zellansteuerung mit Hilfe von Antikörpern. Für eine Anreicherung der Partikel im Tumormodell, *in vivo*, soll der EPR-Effekt (siehe Kapitel 2) ausgenutzt werden. Des Weiteren sollen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel mit Interleukin-2 und siRNA, zur Unterstützung der Tumorabwehr von Seiten der T-Zellen, funktionalisiert werden um auch hier zunächst die Bioaktivität der gebundenen Proteine *in vitro* zu überprüfen.

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

Für die Bioaktivitätstests, *in vitro*, wurden WEHI 164-Zellen (ATCC® CRL-1751™, Maus-Fibroblasten) für die TNF $\alpha$  modifizierten Partikel und CTLL-2 Zellen (IL-2 produzierende, zytotoxische T-Zellen, AG ████████) für die IL-2 modifizierten Partikel verwendet. Für die *in vivo* Tests wurden NodScid Mäuse (NodScid, transgen HLA.A2.1), mit einem Plattenepithelzellkarzinom (A431) verwendet.

Für alle Versuche wurden 45 nm große nicht poröse Siliziumdioxidnanopartikel mit Amino-  
gruppen, zur Kopplung der Wirkstoffe, auf der Oberfläche verwendet.

### 4.2.1 SiO<sub>2</sub>-TNF $\alpha$ Partikel

Die in Kapitel 3.2.2.1 vorgestellten Silicananopartikel mit einem Durchmesser von 45 nm wurden zunächst mit Hilfe einer EDC/NHS-Kopplung mit dem Protein TNF $\alpha$  funktionalisiert. Hierzu wurden 2  $\mu$ g der Nanopartikel in verschiedenen Verhältnissen (von 1:1 bis 1:25) mit dem Tumornekrosefaktor umgesetzt. Nach beendeter Reaktion wurden die Nanopartikel abzentrifugiert und der Reaktionsüberstand wurde auf überschüssiges TNF $\alpha$  untersucht. Diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Nachweisverfahrens, welches in Kapitel 4.1.1.3 beschrieben wurde. Nach der Ermittlung des Restproteins im Überstand kann berechnet werden, wie viel TNF $\alpha$  auf die Nanopartikel gebunden wurde. In Abbildung 64 ist für drei verschiedene Verhältnisse von Nanopartikel zu TNF $\alpha$  (1:25, 1:12,5, 1:6) aufgetragen, wie viel des eingesetzten TNF $\alpha$  an die Partikel gebunden hat.

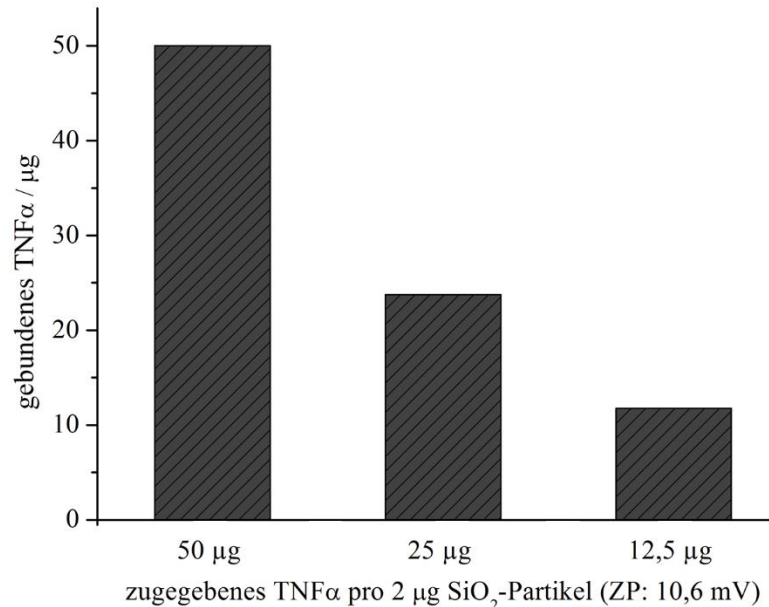


Abbildung 64: TNF $\alpha$ -Bindung an Silicananopartikel. Bestimmung erfolgte über ELISA.

In allen drei Fällen hat eine Bindung von nahezu 100% des Proteins an die Silicapartikel stattgefunden, somit ist bei den Verhältnissen von 1:6 und 1:12,5 noch keine Absättigung der Partikeloberfläche erreicht, da auch im Falle eines Verhältnisses von 1:25 das gesamte, in der Reaktion eingesetzte TNF $\alpha$  gebunden hat. Da theoretisch sehr wenige Proteine pro Nanopartikel reichen um die gewünschte Bioaktivität der Nanopartikel zu erreichen, wurde hier nicht weiter hochskaliert um in den Bereich der Absättigung zu kommen.

Zusätzlich wurde jedoch der Einfluss von einer unterschiedlichen Aminogruppenzahl auf der Partikeloberfläche auf die Bindung des TNF $\alpha$  getestet. Hierzu wurden die SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel zunächst mit drei unterschiedlichen Mengen Aminopropyltriethoxysilan (APS) funktionalisiert und danach das Zetapotential bestimmt. Aus Kapitel 3.2.2.1 ist bekannt, dass unfunktionalisierte Silicapartikel ein negatives Zetapotential besitzen und mit APS abgesättigte Partikel ein Potential von ca. 10 mV. Es wurden Partikel mit einem Potential von 6,4 mV, 7,8 mV und 10,6 mV für eine 1:12,5 Funktionalisierung mit TNF $\alpha$  eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65A dargestellt.

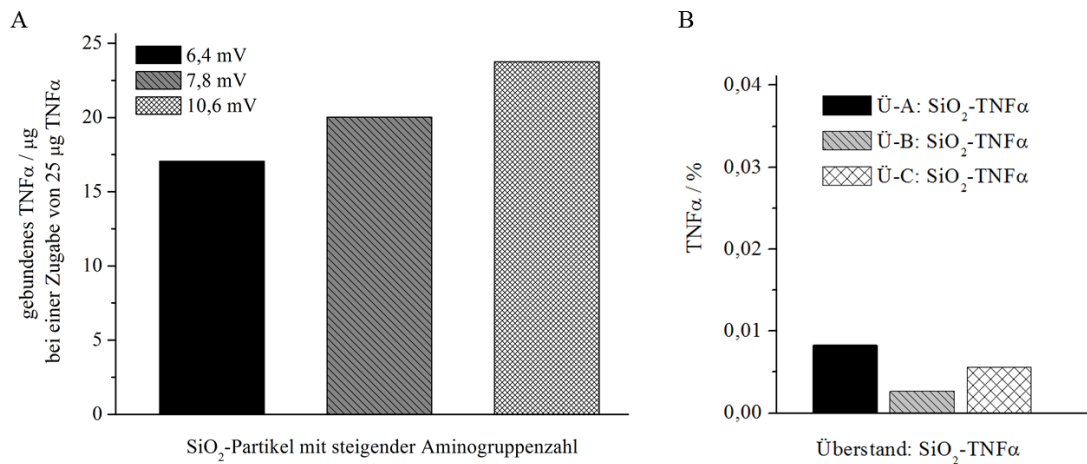


Abbildung 65: A: Verschiedene Mengen an gebundenem TNF $\alpha$ , mit steigender Aminogruppenzahl auf der Nanopartikeloberfläche und B: Stabilität der TNF $\alpha$ -Bindung auf den Silicapartikeln. Bestimmung erfolgte über ELISA.

Mit steigendem Zetapotential, also steigender Aminogruppenzahl auf der Oberfläche der Partikel konnte mehr TNF $\alpha$  auf die Nanopartikel gebunden werden. Bei den ersten beiden Partikelvarianten (6,4 mV und 7,8 mV) scheint der Sättigungsbereich bereits überschritten zu sein, so dass sie die zugegebene Menge an TNF $\alpha$  nicht mehr binden können. In allen weiteren Versuchen wurden die SiO<sub>2</sub>-Partikel mit dem höchsten Zetapotential verwendet. Ebenfalls in Abbildung 65 zu sehen ist ein Stabilitätstest der TNF $\alpha$ -Bindung (B). Hierzu wurden unterschiedliche Partikelchargen, die mit verschiedenen Mengen TNF $\alpha$  funktionalisiert wurden in PBS-Puffer gelagert. Danach wurden sie abzentrifugiert und der Überstand wiederum nach TNF $\alpha$  untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 65B drei verschiedene Nachweise (7,8 mV: 1:6 und 1:12,5; 10,6 mV: 1:6) dargestellt. In allen Proben konnte nahezu kein TNF $\alpha$  gefunden werden, lediglich Mengen von weniger als 0,01% der zuvor gebundenen Menge an TNF $\alpha$ . Es kann also von einer stabilen Bindung ausgegangen werden, weshalb die Partikel nun auf ihre Bioaktivität hin untersucht werden konnten. Durch eine kovalente Bindung des TNF $\alpha$  an die Silicananopartikel kann seine Wirkung, also seine Bioaktivität beeinträchtigt werden, wenn die Bindung zum Beispiel genau an der eigentlich bioaktiven Domäne des Proteins stattfinden würde. Daher wurden die funktionalisierten Nanopartikel im Vergleich zu

reinem  $\text{TNF}\alpha$  an Wehi 164-Zellen getestet. Hierbei handelt es sich um Maus-Fibroblasten, die auf eine Behandlung mit  $\text{TNF}\alpha$  mit Wachstumsstopp und Apoptose reagieren. In Abbildung 66 ist die Mortalitätsrate der Wehi 164-Zellen bei Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{SiO}_2$ - $\text{TNF}\alpha$ -Partikeln gezeigt.

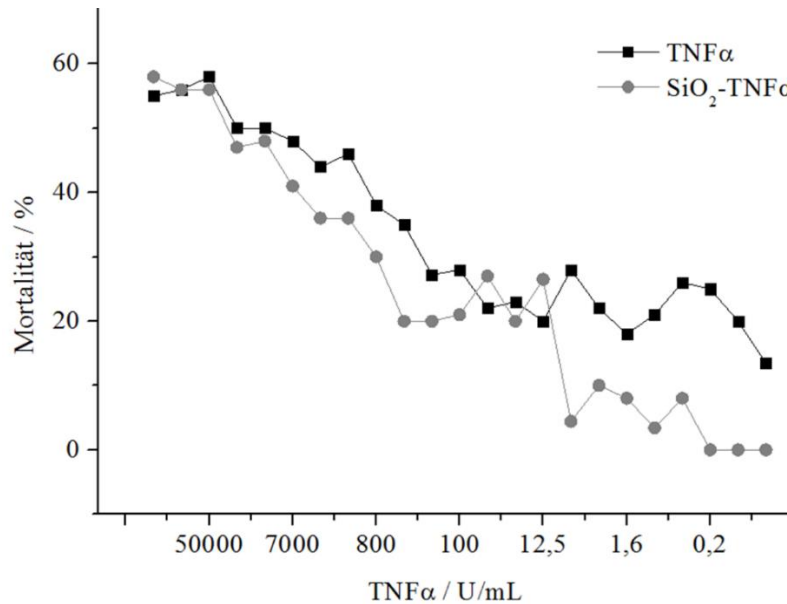


Abbildung 66: Bioaktivitätstest der  $\text{SiO}_2$ - $\text{TNF}\alpha$ -Partikel im Vergleich zu reinem  $\text{TNF}\alpha$  auf Wehi 164-Zellen. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Menge wird in U/mL angegeben, wobei 1 mg  $\text{TNF}\alpha$   $6 \cdot 10^7$  Units entspricht.

Der Verlauf beider Kurven ist vergleichbar, was dafür spricht, dass die Bioaktivität des gebundenen  $\text{TNF}\alpha$  nicht beeinflusst wurde, lediglich bei sehr geringen Konzentrationen sind die Nanopartikel weniger toxisch als das reine  $\text{TNF}\alpha$ . Es kann jedoch durchaus von einem ausreichenden Effekt der Partikel gesprochen werden, sodass es möglich ist  $\text{TNF}\alpha$  an Nanopartikel zu binden ohne dessen Wirkung zu beeinträchtigen.

Als nächstes wurde die Wirkung der Nanopartikel im Maus-Tumormodell getestet. Hierzu wurden NodScid Mäusen, Plattenepithelkarzinomzellen (A431) subkutan injiziert, sodass sich, bereits nach ein paar Tagen ein Geschwulsttumor auf deren Rücken bildet (siehe Abbildung 67).

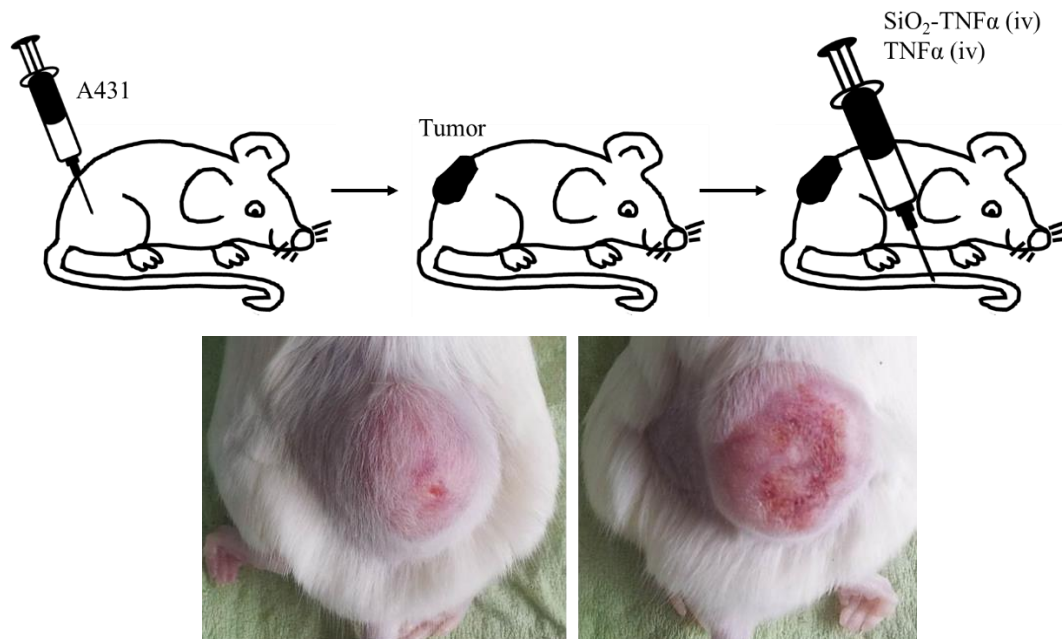


Abbildung 67: Schematische Darstellung des Maustumormodells (oben) und fotografische Aufnahmen von zwei gewachsenen Tumoren auf dem Rücken zweier Mäuse.

Zwei Wochen nach der Injektion der Tumorzellen war bei den Mäusen ein Tumor angewachsen, dessen Größe und somit dessen Wachstum dokumentiert werden konnte. Die Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde nicht gegen den Tumor behandelt, die zweite bekam reines TNF $\alpha$  und die dritte Gruppe wurde mit den TNF $\alpha$  funktionalisierten Nanopartikeln behandelt. Die intravenöse Injektion (iv) von TNF $\alpha$  und SiO<sub>2</sub>-TNF $\alpha$  erfolgte nach 22, 29 und 32 Tagen (Tag 1=Injektion der Tumorzellen). In Abbildung 68 wurde das Wachstum des Tumors im Zeitraum von 14 bis 35 Tagen aufgetragen.

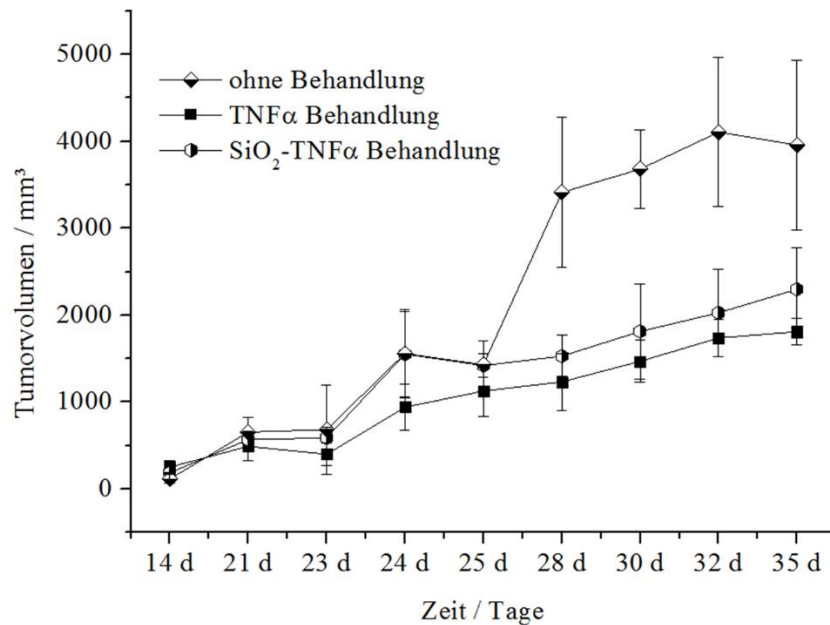


Abbildung 68: Tumorwachstum im Zeitraum von 14 bis 35 Tagen, bei keiner Behandlung und bei Behandlung mit TNF $\alpha$  und SiO $_2$ -TNF $\alpha$ .

Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Behandlung gegen das Wachstum des Tumors erhalten hat, stagniert das Wachstum des Tumors der anderen beiden Gruppen ab dem 25ten Tag. Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  hatte somit in beiden Fällen einen Einfluss auf das maligne Gewebe und konnte ein noch weiteres Wachstum verhindern. Die TNF $\alpha$  funktionalisierten Nanopartikel haben im Vergleich zum reinen TNF $\alpha$  denselben Effekt.

#### 4.2.2 SiO $_2$ -IL-2-Partikel

Die Silicananopartikel wurden analog der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methode anstelle von TNF $\alpha$  mit Interleukin-2 funktionalisiert. Zum Einsatz kamen die 45 nm großen Partikel, mit einem Zetapotential von  $\sim 10$  mV. Die Bindung des Proteins erfolgte über eine EDC/NHS-Kopplung, wobei die Ansätze analog zur TNF $\alpha$ -Kopplung gewählt wurden. Anschließend wurde ebenfalls überprüft ob die Bindung des Proteins dessen Bioaktivität beeinträchtigen kann. Hierzu wurde eine CTLL2-Zelllinie verwendet, welche mit Proliferation auf die Gegenwart von IL-2 reagiert. Das dazugehörige Diagramm ist in Abbildung 69 dargestellt.

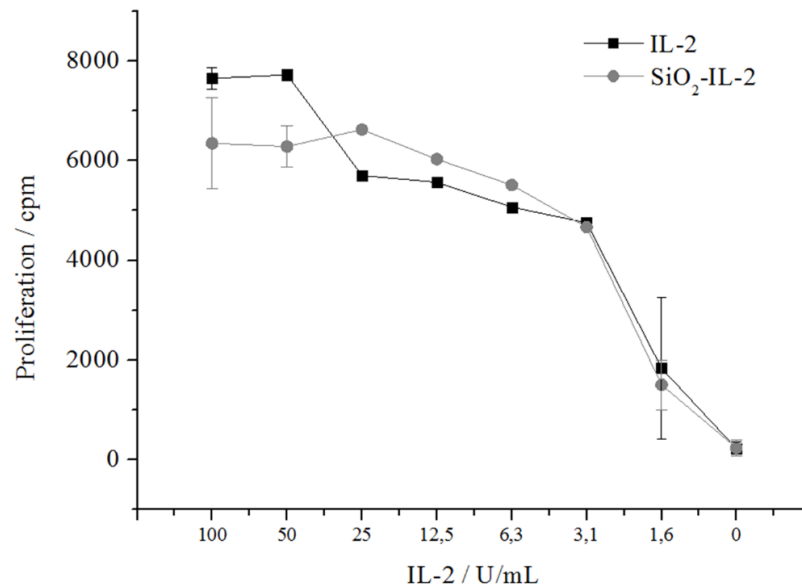


Abbildung 69: CTLL-2 Proliferationstest. Zugabe von reinem IL-2 im Vergleich zu SiO<sub>2</sub>-IL-2-Nanopartikeln. Die IL-2-Menge wird in U/mL angegeben, wobei 1,1 mg IL-2 18\*10<sup>6</sup> Units entspricht.

Die CTLL-2 Zellen wurden zum einen mit den SiO<sub>2</sub>-IL-2-Nanopartikeln und zum anderen mit reinem IL-2 inkubiert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen beider Substanzen behandelt und deren Proliferation beobachtet. Es wurde die Proliferation der Zellen gegen die IL-2-Konzentration aufgetragen. Der Verlauf beider Kurven (reines IL-2 und NP-IL-2) ist fast identisch, was eine noch vorhandene Bioaktivität des gebundenen IL-2 bestätigt.

### 4.2.3 SiO<sub>2</sub>-siRNA-Partikel

Darauffolgend sollte gezeigt werden, dass zusätzlich eine Bindung von siRNA an die Nanopartikel möglich ist. Hierzu wurden zum einen die gleichen Partikel wie auch aus Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 verwendet und zum anderen kamen nackte SiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer Polyethyleniminhülle zum Einsatz.



#### 4.2.3.1 Polyethylenimin Funktionalisierung

Es wurden 45 nm große Silicananopartikel, ohne Aminogruppen auf der Oberfläche mit verzweigtem Polyethylenimin (PEI), in verschiedenen Verhältnissen NP:PEI umgesetzt (Abbildung 70). Nach der Funktionalisierung wurde auch von diesen Partikeln das Zetapotential gemessen und es konnte für ein 1:1 Verhältnis ein Potential von  $7,2 \pm 0,2$  mV ermittelt werden. Diese Partikel wurden dann für die weiteren Versuche mit der siRNA verwendet.

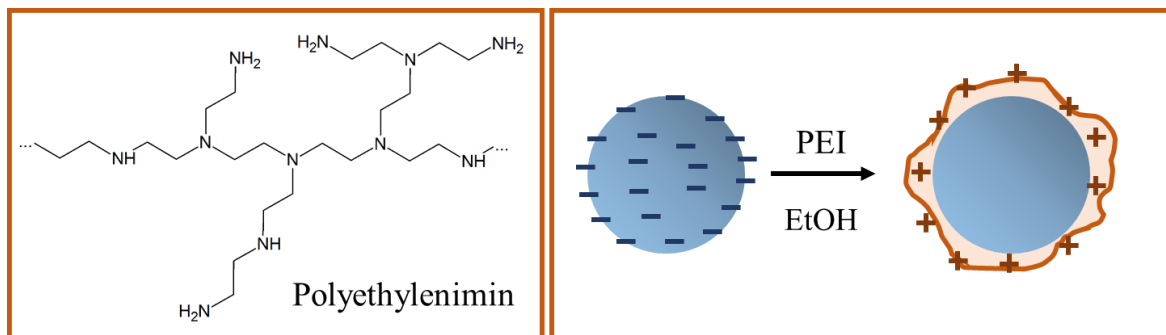


Abbildung 70: Strukturformel des verzweigten Polyethylenimin (links) und schematische Darstellung der Umhüllung der Nanopartikel mit PEI (rechts).

#### 4.2.3.2 siRNA-Funktionalisierung

Die siRNA wird im Gegensatz zu TNF $\alpha$  und IL-2 nicht kovalent an die Partikel gebunden. Aufgrund ihrer negativ geladenen Oberfläche, aus dem Phosphatkettenrückgrat, kann sie durch ihre Ladung an die positiven Aminogruppen adsorbiert werden.

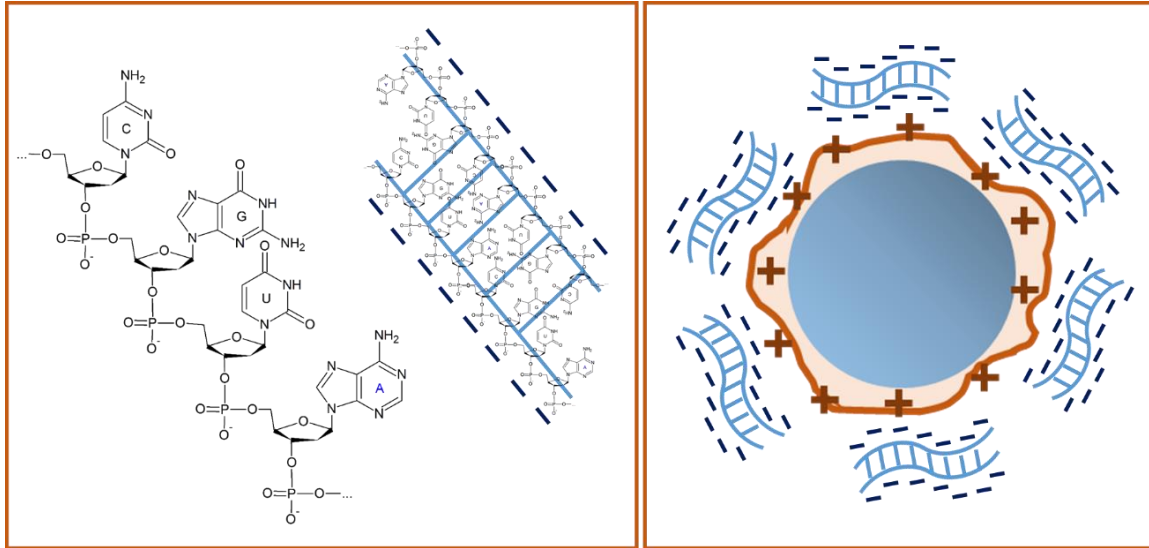


Abbildung 71: Strukturaufbau eines RNA-Strangs (links) und Silicananopartikel mit einer Polyethyleniminhülle und adsorbierten siRNA-Molekülen (rechts).

Beide Partikelsorten wurden nun mit verschiedenen Mengen siRNA umgesetzt, um das beste Verhältnis von Nanopartikel zu siRNA zu erreichen. Hierzu wurde die siRNA im 5-, 10- und 20-fachen Überschuss zu den Partikeln gegeben. Zur Kontrolle ob die siRNA an die Partikel gebunden hat, wurden diese und die Reaktionsüberstände mit Hilfe der Gelelektrophorese auf freie siRNA untersucht. Da die siRNA nicht kovalent an die Partikel gebunden wurde, sondern lediglich über die Ladung wurde auch überprüft wie stabil die Bindung der siRNA ist. Dazu wurden die funktionalisierten Nanopartikel wieder in PBS-Puffer überführt und die Überstände in einem Zeitraum von bis zu 6 Tagen erneut gelelektrophoretisch untersucht.

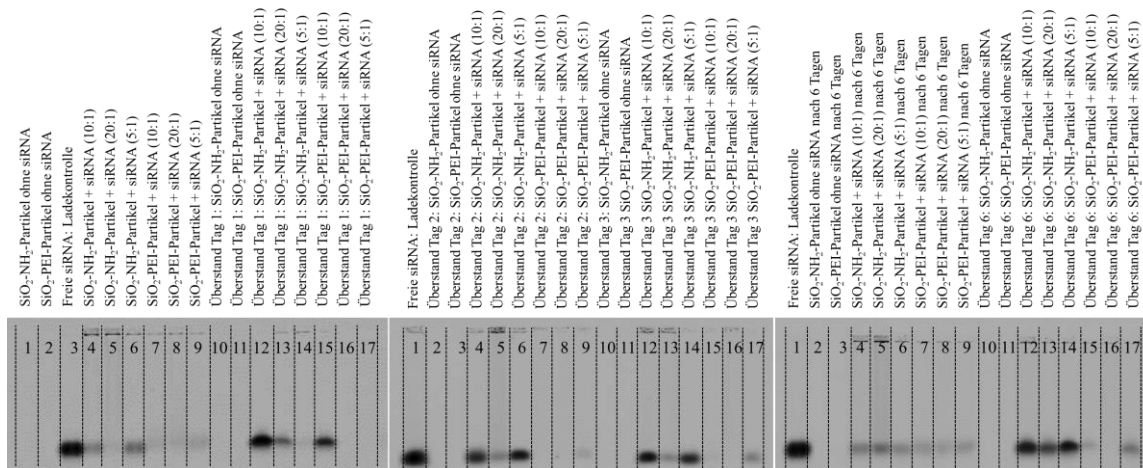


Abbildung 72: Verschiedene Gele mit Nanopartikel-siRNA, Reaktionsüberstands- und Stabilitätsproben.

Auf dem ersten Gel (siehe Abbildung 72) wurden die fertigen Nanopartikel und die frischen Reaktionsüberstände aufgetragen. Hier ist zu sehen, dass bei den  $\text{SiO}_2$ -PEI-Partikeln weniger freie siRNA vorhanden ist (Bande 7-9 und 15-17), die Komplexierung hat mit diesen Partikeln somit besser funktioniert. Dies kann sich durch die verzweigte Struktur des Polyethylenimins erklären lassen, die an manchen Stellen wie ein Chelator wirken kann, um die siRNA besser zu binden. Mit den einzelnen freien Aminogruppen der „Standard“- $\text{SiO}_2$ -Partikel ist das nicht möglich. Die anderen beiden Gele zeigen die Überstände, die nach 2, 3 und 6 Tagen entnommen wurden und nochmal die Nanopartikel selbst nach 6 Tagen. Auch hier ist zu sehen, dass bei den Partikelproben, mit der PEI-Schicht deutlich weniger siRNA wieder freigesetzt wird (siehe Gel 2, Bande 7-9). Es kann also abschließend gesagt werden, dass mit beiden Partikelsorten eine Komplexierung von siRNA möglich ist, wobei die Bindung bei den Silicapartikeln mit einer Polyethyleniminhülle deutlich stabiler ist und länger hält. Dies ist für eine spätere Anwendung sehr wichtig, da die siRNA erst am Wirkungsort, in den regulatorischen T-Zellen freigesetzt werden darf.

### 4.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Silicananopartikel mit TNF $\alpha$ , IL-2 und siRNA funktionalisiert werden können. Die Bioaktivität von TNF $\alpha$  wurde durch die Bindung an die Partikel nicht beeinträchtigt, weshalb eine Untersuchung der Partikel, zunächst mit den SiO<sub>2</sub>-TNF $\alpha$ -Nanopartikeln, *in vivo* erfolgen konnte. Hier konnte ein ähnlicher antitumoraler Effekt erreicht werden, wie bei einer Behandlung mit freiem TNF $\alpha$ . In weiteren *in vivo* Experimenten sollen die Lebertoxizitätswerte der Mäuse beobachtet werden um zu untersuchen ob die Partikel im Vergleich zu reinem TNF $\alpha$  systemisch weniger toxisch wirken. Dies kann bereits Aufgrund des EPR-Effektes der Fall sein, durch den eine erhöhte Anreicherung der Partikel im Tumor stattfinden sollte, und somit eine geringere Konzentration an TNF $\alpha$  im Blutkreislauf vorhanden sein sollte. Durch eine gezielte Steuerung und Bindung der Partikel an den Tumor sollte eine bessere Wirkung und eine geringere Toxizität (auf den Körper) erreicht werden. Diese gezielte Ansteuerung der Partikel an das maligne Gewebe kann mit Hilfe einer zusätzlichen Funktionalisierung mit einem spezifischen Antikörper erfolgen. Dadurch sollen die Nanopartikel zielgerichtet zum Tumor gelangen und über eine Antikörper-Rezeptor-Wechselwirkung an das Karzinom binden. Dies soll zum einen zu einer höheren TNF $\alpha$ -Konzentration im Tumor und somit zur erhöhten Apoptose führen und zum anderen freies TNF $\alpha$  im Blutkreislauf vermeiden. Als Zielstrukturen käme hier der anti-HLA-A2-Antikörper (Maus, monoklonal, BB7-2, IgG2b) in Frage, aber auch die Verwendung des anti-EGFR-Antikörper (Kapitel 6) wäre bei einer ausreichenden Expression von EGF denkbar.

Gerade die Regulierung der TNF $\alpha$ -Konzentration im Blut ist sehr wichtig, da TNF $\alpha$  für die lokale Behandlung zwar sehr gut geeignet ist aber wenn es systemisch auf den ganzen Körper wirken kann, verursacht es große Schäden. Wenn also eine gezielte Ansteuerung und feste Bindung an das Tumorgewebe erreicht werden kann, ist auch die Behandlung von anderen Tumoren, neben der bisherigen Behandlung von Geschwulsttumoren an Armen und Beinen denkbar.

Für das Ziel der indirekten Tumorabwehr über die T-Zellen, bzw. die regulatorischen T-Zellen konnte die Bindung von IL-2 und siRNA an die Partikel gezeigt werden. Auch die Bioaktivität

des Interleukin-2 wurde nicht durch die Bindung an die Nanopartikel beeinträchtigt. Als nächstes muss hier die Bioaktivität von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-2 überprüft werden, wenn die Partikel zusätzlich mit siRNA funktionalisiert sind. Die Funktionalisierung der Partikel mit siRNA und IL-2, soll über die Bindung von IL-2, oder auch  $\text{TNF}\alpha$ , an die Aminogruppen des Polyethylenimins erfolgen. Dazu soll nach der siRNA-Funktionalisierung eine weitere Polyethyleniminschicht um die Partikel gehüllt werden, welche dann zum einen die siRNA daran hindern soll zu readsorbieren und zum anderen die Ankergruppen für die Proteine liefern soll. Danach muss eine Untersuchung der Partikel an regulatorischen T-Zelllinien erfolgen, um zu sehen ob FoxP-3 herunter reguliert werden kann und so eine Inhibition der Proliferation dieser Zellen erreicht werden kann.

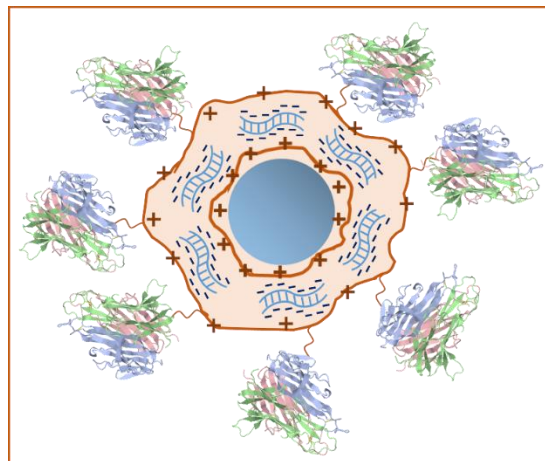


Abbildung 73: Schematische Darstellung eines  $\text{SiO}_2$ -Partikel mit Polyethyleniminhülle, siRNA und  $\text{TNF}\alpha$  (und/oder IL-2) auf der Oberfläche.

Silicananopartikel, die mit  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2 und einer siRNA funktionalisiert sind weisen somit ein hohes Potential in der Krebsimmuntherapie auf. Zum einen sorgt das IL-2 und die siRNA für eine Inhibition der  $T_{\text{Regs}}$ , damit die T-Zellen den Tumor erkennen können und zum anderen ist das  $\text{TNF}\alpha$  direkt in der Lage die Apoptose des malignen Gewebes einzuleiten oder weitere Immunzellen anzulocken.



# Kapitel 5

## Fluoreszenzmarkierte SiO<sub>2</sub>-Partikel zur Tumorrand- kontrastverstärkung von Kopf-Hals-Tumoren

### 5.1 Einführung und Theorie

In Kooperation mit der AG [REDACTED] (HNO-Klinik, Universitätsmedizin Mainz) und der HNO-Klinik der [REDACTED]-Wiesbaden (Dr. [REDACTED]) wurde ein System entwickelt, in dem über eine Bindung von fluoreszenzmarkierten Silicananopartikeln an den EGF-Rezeptor von malignem Gewebe, ein Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom mit Hilfe eines konfokalen Laserendoskops sichtbar gemacht werden konnte. Hierzu wurden die Versuche mit dem Endoskop in Zusammenarbeit mit [REDACTED] (Medizinische Klinik [REDACTED]) von [REDACTED] und Dr. [REDACTED] vorgenommen und die Einzelzelleexperimente wurden von [REDACTED], AG [REDACTED], Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Bei einem Kopf-Hals-Karzinom handelt es sich um malignes Gewebe im Kopf-Hals-Bereich, welches zu den Plattenepithelkarzinomen gehört. Weltweit erkranken daran mehr als 500.000 Menschen pro Jahr, das macht ungefähr 6% aller Krebserkrankten aus. <sup>[92], [93]</sup> Bei einer frühzeitigen Erkennung dieser Krankheit, liegt die Überlebensrate bei ca. 90%, allerdings wird das Karzinom oftmals (bei ca. 60% der Betroffenen) zu spät erkannt, was eine Behandlung sehr erschwert oder nicht mehr möglich macht. <sup>[94], [95]</sup> Die derzeitige Behandlung von diesen Kopf-Hals-Karzinomen ist die operative Entfernung des Tumors, eine Chemotherapie oder eine Strahlentherapie. Meistens wird der chirurgische Eingriff mit einer der letzten beiden Therapien kombiniert. <sup>[96], [97]</sup>

Für eine hohe Heilungschance ist es sehr wichtig, dass das maligne Gewebe operativ komplett entfernt wird, da sonst ein erneutes Wachstum des Gewebes oder eine Metastasierung zu befürchten ist. Um dies zu gewährleisten wird meistens sogar eine R0-Resektion durchgeführt, d.h. es wird zusätzlich noch ein 1-2 cm breiter Rand gesundes Gewebe um den Tumor mit entfernt. Trotz solch einer R0-Resektion kann es noch vorkommen, dass malignes Gewebe im Körper zurück bleibt, weshalb darüber hinaus immer noch eine Chemo- oder Strahlentherapie erforderlich ist. Um diese, den Körper sehr belastenden Therapien evtl. vermeiden zu können oder eine erhöhte Heilungschance zu erzielen, wird nach einer Methode gesucht, diesen chirurgischen Eingriff zu optimieren. Es gibt bereits zahlreiche Veröffentlichungen, in denen malignes Gewebe zielgerichtet markiert wird, um es besser sichtbar zu machen und somit besser entfernen zu können. <sup>[92]</sup>

Im folgenden Kapitel wird ein Ansatz vorgestellt, in dem die Plattenepithelkarzinome mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Silicananopartikeln visualisiert werden sollen. Die Bindung der Partikel an die Tumorzellen soll über den anti-EGFR-Antikörper an den EGF-Rezeptor der Zellen geschehen. Das markierte maligne Gewebe soll anschließend mit einem konfokalen Laserendoskop sichtbar gemacht werden, was im Optimalfall zu einer bildgebenden zellulären Auflösung führt und im Falle eines operativen Eingriffes eine komplette Entfernung des krankhaften Gewebes ermöglichen kann.



## 5.1.1 Grundlagen

### 5.1.1.1 Konfokales Laserendoskop

Ein Endoskop ist ein häufig in der Medizin eingesetztes Gerät, welches es ermöglicht, aufgrund seiner oft flexiblen schlauchartigen Form, ins Innere von lebenden Organismen zu schauen. Es handelt sich hierbei um ein Lichtmikroskop, bei dem Bild und Licht über flexible Glasfaserkabel übertragen werden. Ein spezielles Endoskop ist das hier verwendete konfokale Laserendoskop.<sup>[98]</sup> Die basierende Technik ist die konfokale Lasermikroskopie. Hierbei wird nicht wie bei der konventionellen Lichtmikroskopie das gesamte Präparat gleichzeitig beleuchtet, sondern nur in Bruchteilen. Mit Hilfe einer Lochblende kann gewährleistet werden, dass immer nur ein kleiner Teil der Probe beleuchtet wird. So wird die komplette Probe Stück für Stück abgerastert und aus allen Einzelbildern ein Gesamtbild berechnet. Hierbei handelt es sich um ein Graustufenbild mit 1500-facher Vergrößerung.<sup>[98]</sup> Durch diese Methode gelangt nur eine geringe Menge Licht, mit einem Volumen, welches gerade den Fokuspunkt einschließt zum Detektor, wodurch Bilder mit einem sehr hohen Kontrast erzeugt werden können. Bei der Lichtquelle handelt es sich hier um blaues Laserlicht<sup>[98]</sup>, welches den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff (im Wellenlängenbereich von 400 – 500 nm) anregen und so das markierte Gewebe sichtbar machen soll. Diese neue Art der Endoskopie ermöglicht eine Detektion von zellulären und subzellulären Komponenten und deren Beurteilung.

### 5.1.1.2 Kopf-Hals-Karzinom und EGF-Rezeptor

Bei diesem Karzinom handelt es sich um ein Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (engl.: *head and neck squamous cell carcinoma* - HNSCC), welches als maligne Epithelzelle aus den z.B. Haut-, Mund- und Schleimhautplattenepithelien hervorgeht. In Abbildung 74 ist solch ein Tumor im Rachenbereich abgebildet.



Abbildung 74: Plattenepithelkarzinom im Rachenbereich. <sup>[99]</sup>

Dieser Zelltyp soll mit Hilfe der SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel zielgerichtet angesteuert und markiert werden, weshalb zunächst auf zellulärer Ebene verstanden werden muss, wie dies umzusetzen ist. Wie bereits in den allgemeinen Grundlagen in Kapitel 2.3.3 beschrieben wurde exprimieren alle Zellen verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, um äußere Signale zu empfangen oder weiter zu leiten. Um einen Zelltyp spezifisch ansteuern zu können, werden die Zielstrukturen benötigt, die an dessen Rezeptoren binden können.

Ein sehr bekannter Rezeptor, den alle Zellen auf ihrer Oberfläche exprimieren ist der sogenannte epidermale Wachstumsfaktorrezeptor, der EGF-Rezeptor (engl.: *epidermal growth factor receptor*). Der EGF-Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor und gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen. Er besitzt einen Membrandurchgang und intrinsisch (im inneren der Zelle) eine Kinase-Domäne mit einer ATP-Bindungsstelle zur Phosphorylierung. Durch eine extrazelluläre Bindung eines Liganden, wie des epidermalen Wachstumsfaktors EGF oder des transformierenden Wachstumsfaktors TGF, wird der Rezeptor aktiviert. Dabei ändert sich dessen räumliche Konformation und es wird eine Dimerisierung mit einem zweiten EGF-Rezeptor induziert. Bei diesem Vorgang werden seine Tyrosinkinasen im Zytoplasma aktiviert, welche spezifische Phosphatreste an gezielte Tyrosinreste übertragen. Die phosphorylierten Reste können verschiedene Proteine rekrutieren was zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege ins Zellinnere führt. Diese Signaltransduktion bei der Bindung von EGF kann das Zellwachstum stimulieren oder die Apoptose inhibieren. <sup>[100]</sup>

Bei verschiedenen Tumorarten ist dieser Rezeptor überexprimiert oder mutiert, was zu einer erhöhten Bindung von EGF und somit zu einer erhöhten und unkontrollierten Anregung des Zellwachstums führt. Es gibt bereits neuartige Krebstherapien, in denen dieser Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Cetuximab (Erbitux<sup>®</sup>) blockiert wird um eine weitere Zellproliferation zu vermeiden. <sup>[101]</sup>

In dieser Arbeit wird die Überexpression dieses Rezeptors bei malignem Gewebe ausgenutzt, um eine Bindungsstelle für die Nanopartikel zur Verfügung zu haben. So kann gewährleistet werden, dass eine ausreichende Fluoreszenzmarkierung an das Karzinom stattfindet um dieses sichtbar zu machen. Ob dieser Rezeptor wirklich überexprimiert ist, kann durch eine Anfärbung überprüft werden.

### 5.1.1.3 Aufbau und Kopplung eines Antikörpers

Bei dem anti-EGFR-Antikörper handelt es sich um ein Immunglobulin-G Antikörper (IgG-AK, ca. 150 kDA schwer und 9 nm groß). <sup>[102]</sup> Der Aufbau eines solchen Antikörpers ist in Abbildung 75 schematisch dargestellt.

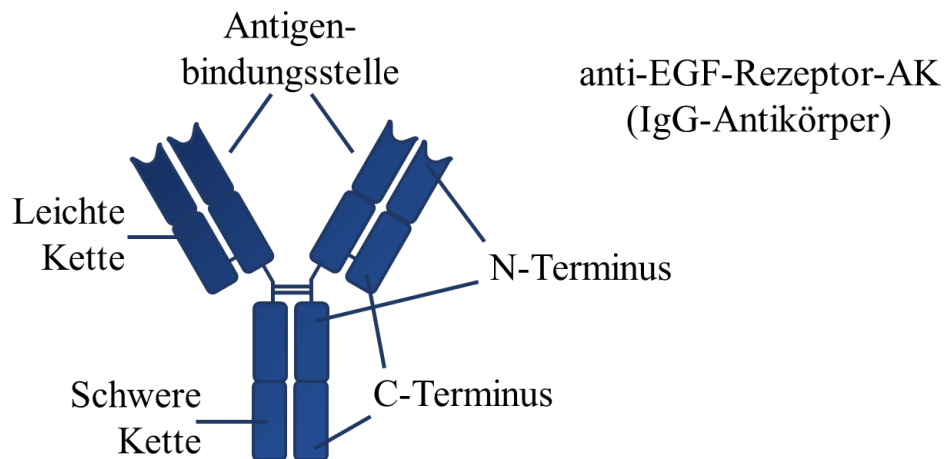


Abbildung 75: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers (z.B.: EGF,  $R_h=4,5$  nm).

Am C-Terminus des Antikörpers befinden sich freie Carboxylgruppen, die für einen Kopplungsmechanismus zur Verfügung stehen. Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, kann der

Antikörper analog über eine EDC/NHS-Kopplung an die vorhandenen Aminogruppen auf der Oberfläche der Silicananopartikel gebunden werden.

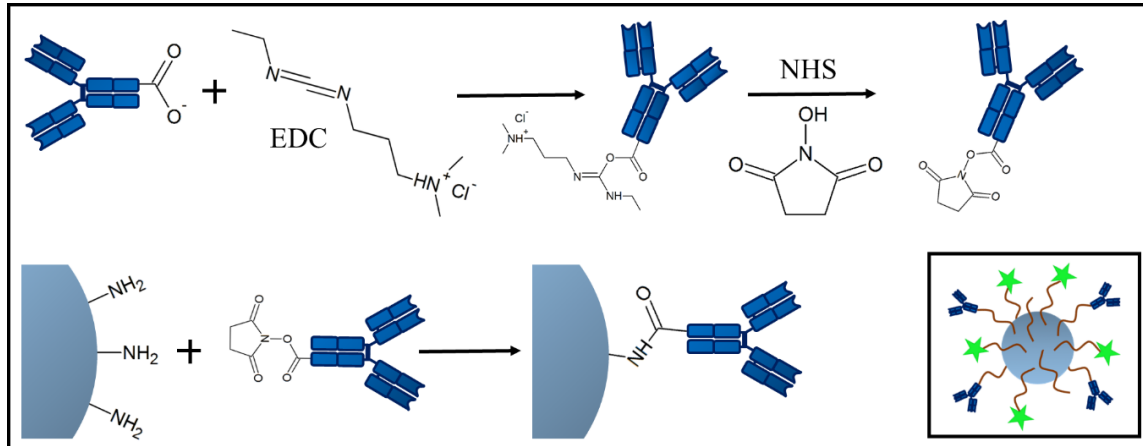


Abbildung 76: Schematische Darstellung des Mechanismus der EDC/NHS-Kopplung. Bindung einer Carboxylgruppe an eine Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung.

Wie in Abbildung 76 zu sehen ist bindet zunächst das Aktivierungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, an die freie Carbonsäure des Antikörpers und bildet ein O-Acylisoharnstoff. So kann das N-Hydroxysuccinimid leichter bzw. schneller (Absenkung der Aktivierungsenergie) an die Carbonsäure gebunden werden. Bei dem entstandenen Zwischenprodukt handelt es sich um einen sogenannten NHS-Ester, eine aktivierte Carbonsäure. Es ist auch eine Kopplung ohne NHS möglich, allerdings ist der NHS-Ester isolierbar, lagerbar und hydrolysestabiler als der O-Acylisoharnstoff. Der so entstandene Ester reagiert sehr leicht unter Ausbildung einer Amidbindung mit Aminogruppen ( $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) und ist von vielen Substanzen, wie zum Beispiel Farbstoffen, bereits käuflich erwerblich.

#### 5.1.1.4 Aufgabe

Es sollen fluoreszenzmarkierte Silicananopartikel mit dem anti-EGFR-Antikörper funktionalisiert werden, um an die EGF-Rezeptoren von Kopf-Hals-Plattenepithelzellen binden zu können. Durch die Bindung der Partikel an das maligne Gewebe, was in Abbildung 77 schematisch dargestellt ist, soll der Tumor fluoreszenzmarkiert werden. Diese Markierung soll dann eine Unterscheidung von gesundem Gewebe und krankhaftem Tumorgewebe mit dem Konfokaleidoskop ermöglichen, sodass das maligne Gewebe komplett operativ entfernt werden kann (R0-Resektion).

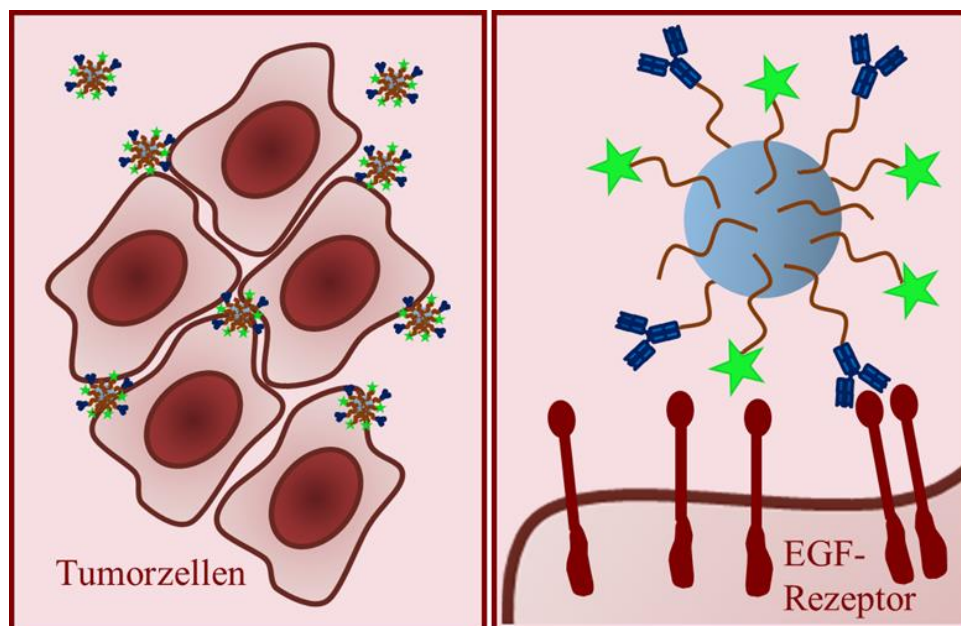


Abbildung 77: Schematische Darstellung der Nanopartikelbindung an die EGF-Rezeptoren des Tumorgewebes.

## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Synthese der hier verwendeten SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Es kamen sowohl die sphärischen Partikel aus der klassischen Stöber-Synthese, als auch aus der Synthese über die reverse Mikroemulsion in zwei verschiedenen Größen zum Einsatz. Die bereits mit Aminogruppen funktionalisierten 25 nm und 45 nm großen Silicapartikel wurden im ersten Schritt mit einem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt. Diese Fluoreszenzmarkierung dient sowohl der Verfolgung der Partikel in den Einzelzell-experimenten, als auch in den Versuchen am entnommenen Gewebe. Als Farbstoff wurde Fluoreszinisothiocyanat (FITC) verwendet, welches über seine Isothiocyanatgruppe leicht an nucleophile Gruppen, wie Amine gebunden werden kann. Des Weiteren ist dieser Farbstoff in der Medizin am Menschen zugelassen, was für eine spätere potentielle Anwendung sehr wichtig ist.<sup>[103]</sup>

Die Kopplung des Farbstoffes an die Silicananopartikel ist in Abbildung 78 schematisch dargestellt und erfolgt unter der Zugabe von FITC zu den Partikeln in Ethanol bei Raumtemperatur.

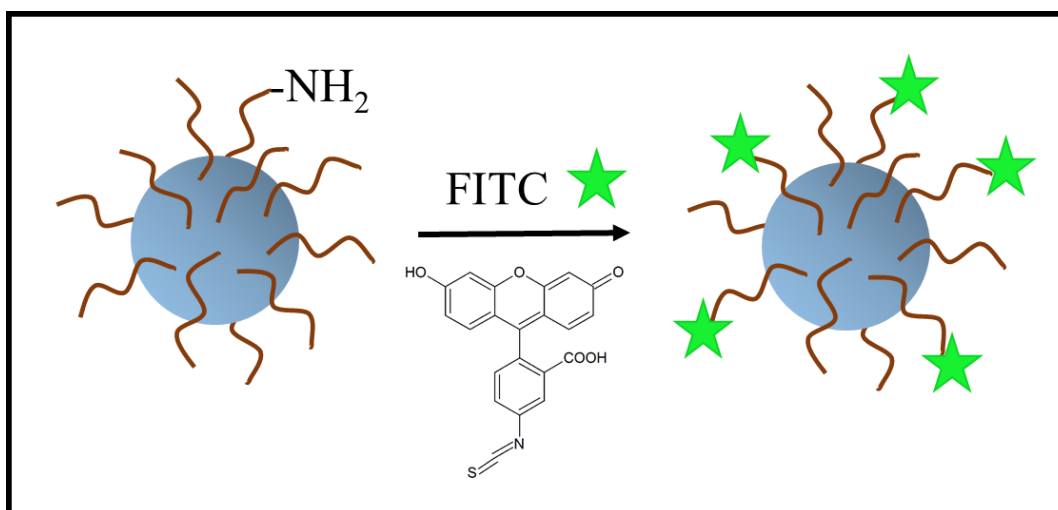


Abbildung 78: Schematische Darstellung der Farbstofffunktionalisierung der Nanopartikel. Der Farbstoff FITC kann über seine Isothiocyanatgruppe an die Aminogruppen auf der Partikeloberfläche binden.

Ist die Reaktion beendet, werden die Partikel mehrmals durch abzentrifugieren und redispergieren in Ethanol gewaschen um eventuellen überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

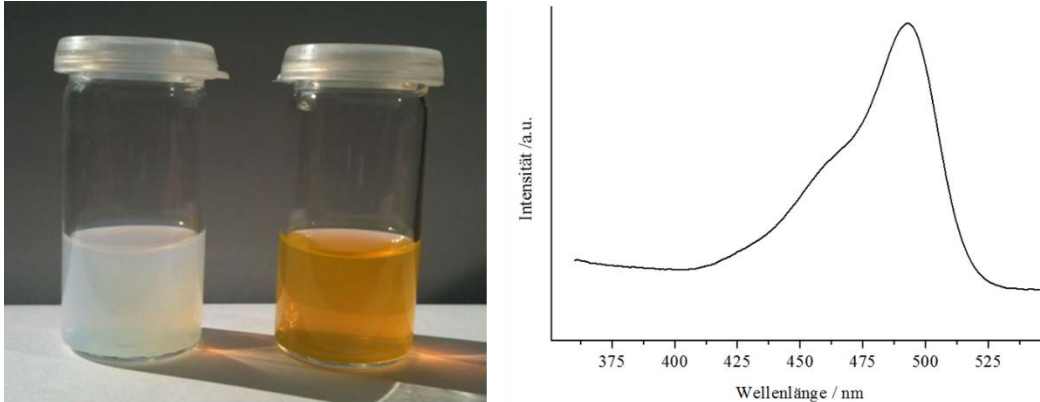


Abbildung 79: Fotografie von Silicananopartikeln in Ethanol. Links: ohne FITC, rechts: mit FITC. UV-Vis-Spektrum von SiO<sub>2</sub>-FITC-Partikeln (Absorption von FITC bei 494 nm).

Nach der Farbstofffunktionalisierung erfolgt anschließend die eigentliche Funktionalisierung mit der Zielstruktur zur Bindung an die Tumorzellen. Hierzu wurde der anti-EGFR-Antikörper verwendet, der über seine freie Carboxylgruppe am C-terminalen Ende mit einer EDC/NHS-Kopplung an die freien Aminogruppen der Partikel binden kann. Der Kopplungsmechanismus wurde bereits in Kapitel 6.1.1.3 in Abbildung 76 gezeigt. Die Kopplung erfolgt analog der in Kapitel 6 beschriebenen in Ethanol oder DMSO, dabei werden alle Komponenten in das Lösungsmittel gegeben und über Nacht bei 15°C auf einer Schüttelplatte zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wird erneut gewaschen um die Kopplungsreagenzien zu entfernen. Für alle folgenden Experimente wurden die Partikel nach dem letzten Waschschrift unter einer Sterilbank in PBS-Puffer (engl.: *phosphate buffered saline*) überführt und gekühlt gelagert.

### 5.2.1.1 Einzelzellexperimente

Zu Beginn wurden die Partikel auf ihre Zytotoxizität getestet. Hierzu wurden die verwendeten HNSCCUM-01T-Zellen für zwei Minuten, mit fünf verschiedenen Konzentrationen der Partikel inkubiert. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und deren Viabilität nachgewiesen. Die Inkubationszeit von zwei Minuten wurde analog zu den Inkubationszeiten der Versuche mit den Tumorgewebeproben am Endoskop gewählt. In Abbildung 80 sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente dargestellt.

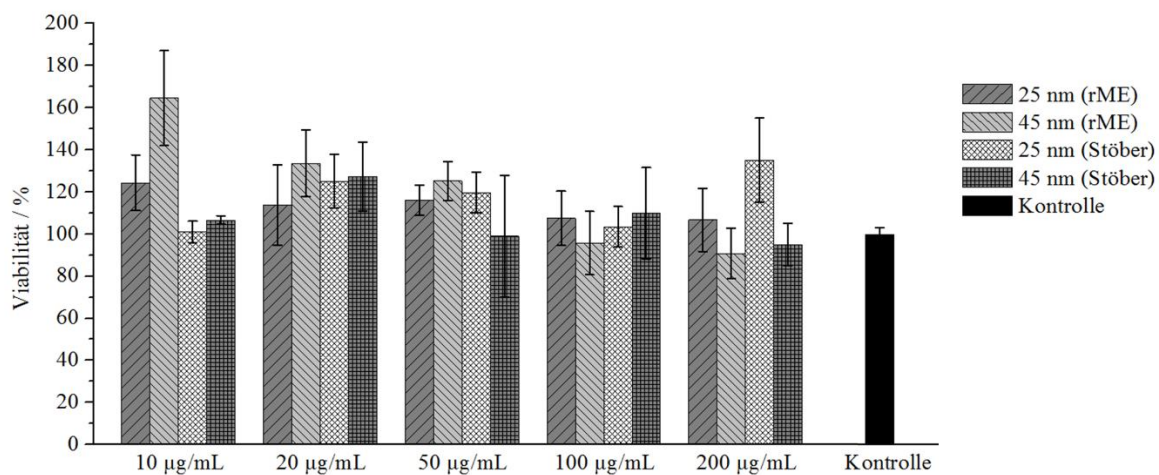


Abbildung 80: Zellviabilitätstest mit verschiedenen Silicananopartikeln bei fünf verschiedenen Konzentrationen.

Alle Partikel zeigen keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Bei vielen Proben ist sogar eine Viabilität der Zellen von über 100% zu beobachten, was eine weitere Anwendung der Partikel möglich macht. Für die weiteren Experimente wurde nur noch eine der beiden Partikelsorten verwendet.



Bevor die Einzelzellexperimente zur Bindung der Partikel an die HNSSC-Zellen begonnen wurden, wurde überprüft ob die verwendeten Zellen den EGF-Rezeptor exprimieren. In Abbildung 81 ist eine Fluoreszenzmikroskopaufnahme von HNSSC-Zellen zu sehen, deren Zellkern mit Dapi (blau) und deren EGF-Rezeptoren mit FITC (grün) angefärbt wurden. Es ist eine eindeutige Grünfärbung zu erkennen, was für eine Überexpression von EGFR spricht. Die Zellen sollten somit für die nachfolgenden Experimente/Anwendungen geeignet sein.

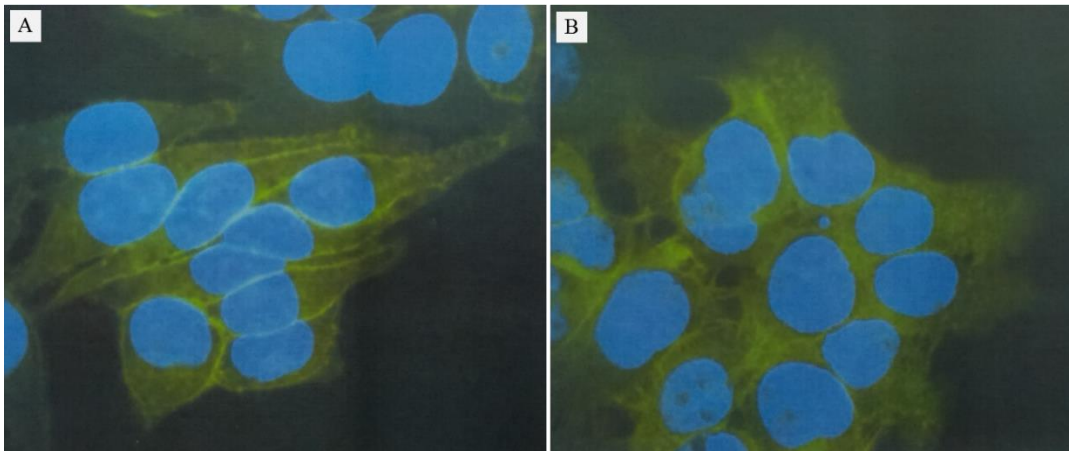


Abbildung 81: Anfärbung von EGFR (FITC/grün) und Zellkern (Dapi/blau) von A: HNCCUM-01T Zellen und B: HNCCUM-02T Zellen. <sup>[104]</sup>

Die Zellen wurden nicht nur auf ihre Viabilität hin betrachtet, sondern es wurden auch Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von den Zellen mit den Partikeln gemacht um mehr Aufschluss darüber zu bekommen wo die Partikel sich befinden. Hierzu wurden die Zellen wieder für zwei Minuten mit den Partikeln inkubiert und anschließend fixiert. Danach wurden die Zellen gewaschen um nicht gebundene Partikel zu entfernen. In Abbildung 82 sind diese Aufnahmen, für 45 nm große Partikel zu sehen. Gezeigt ist zum einen die grüne Fluoreszenz des Fluoreszinoisothiocyanats auf den Nanopartikeln und zum anderen die rote Fluoreszenz der Phalloidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 Anfärbung des Aktinfilaments (Teil des Zytoskeletts der Zelle).

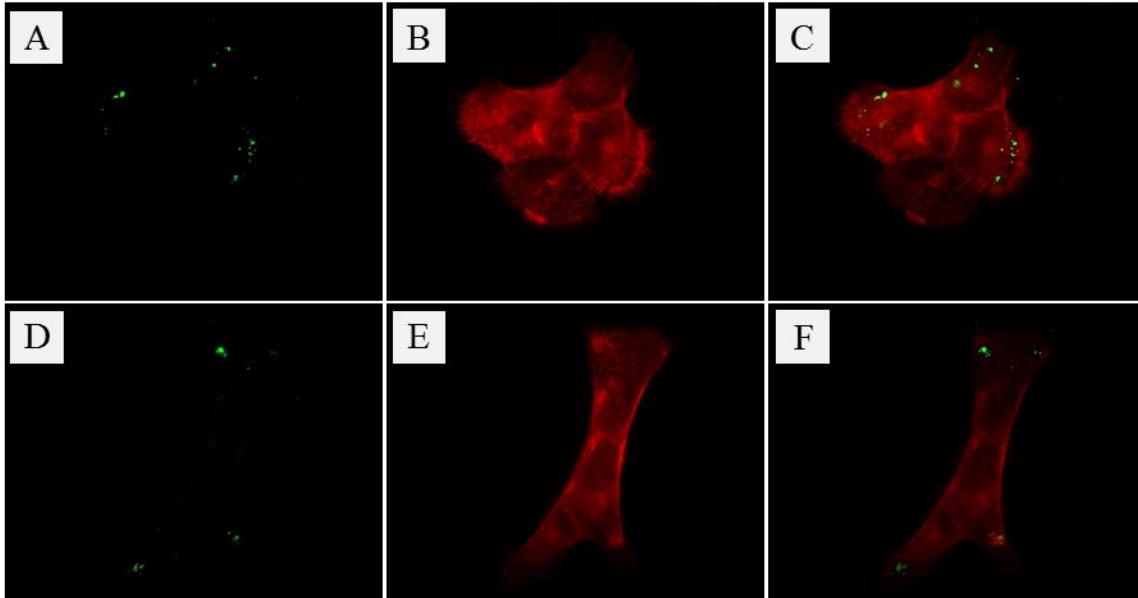


Abbildung 82: Fluoreszenzbildaufnahmen von HNSCCUM-02T-Zellen nach 2 Minuten Inkubationszeit mit 45 nm SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. A, D: FITC von den Nanopartikeln, B, E: Phalloidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 zur Anfärbung der Zellmembran und C, F: überlagertes Bild.

In den Abbildungen C und F ist jeweils das überlagerte Bild von den Nanopartikeln und den Zellen zu sehen. Es ist zu erkennen, dass eine Ablagerung der Nanopartikel auf der Zellmembran vorhanden ist, was für eine erfolgreiche Bindung der Partikel an die EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche spricht.

Weiterhin wurden TEM-Aufnahmen von den Partikeln mit den Zellen gemacht, welche in Abbildung 83 gezeigt sind, um weitere Informationen zum Aufenthaltsort der Partikel zu erhalten.

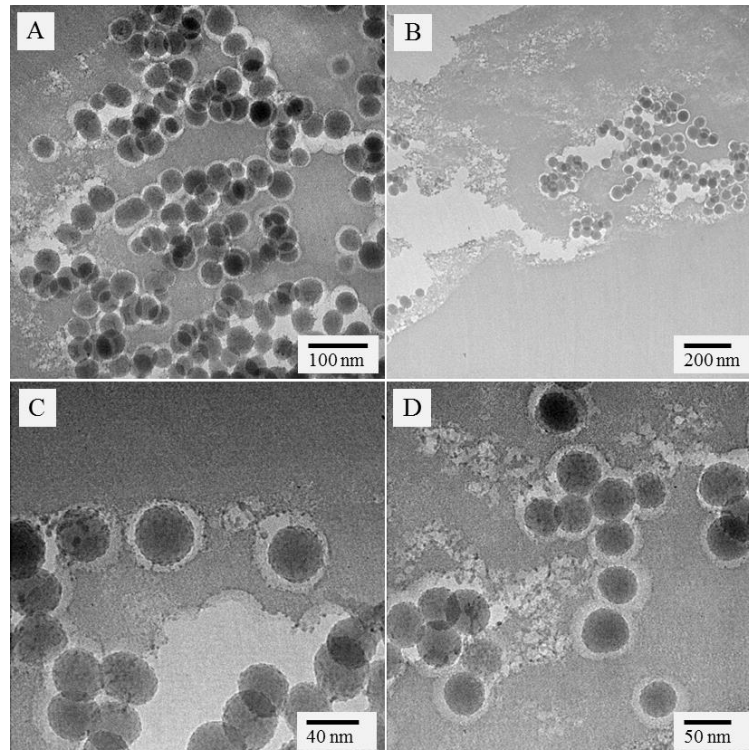


Abbildung 83: TEM-Aufnahmen von Silicananopartikeln an der Zellmembran.

Die TEM-Aufnahmen zeigen Teile der Zellmembran, an der die Partikel teilweise einzelnen und teilweise in kleinen Agglomeraten angelagert sind. Diese Erkenntnisse bestätigen zusätzlich eine Bindung der Partikel an die Karzinomzellen.

### 5.2.1.2 Experimente an entnommenen Gewebeproben

Im Folgenden wurden von Patienten entnommene Gewebeproben, anstelle der bisher verwendeten einzelnen Zellen, für die Versuche mit den anti-EGFR-Antikörper funktionalisierten  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln verwendet. Hierzu wurde sowohl Tumorgewebe, als auch Normalgewebe, also gesundes Gewebe, für zwei Minuten mit den Partikeln inkubiert. Dazu wurden 100  $\mu\text{L}$  der Nanopartikellösung (PBS-Puffer-Lösung, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), in ein Schnappdeckelgefäß gegeben und die Gewebeprobe in die Lösung getaucht. Nach beendeter Inkubationszeit wurde das Gewebestück wieder aus der Nanopartikellösung entnommen und mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9%) abgespült um nicht gebundene Partikel zu entfernen.

Danach wurden beide Gewebeproben auf das konfokale Laserendoskop gelegt und Aufnahmen davon angefertigt, die in Abbildung 84 und Abbildung 85 zu sehen sind.

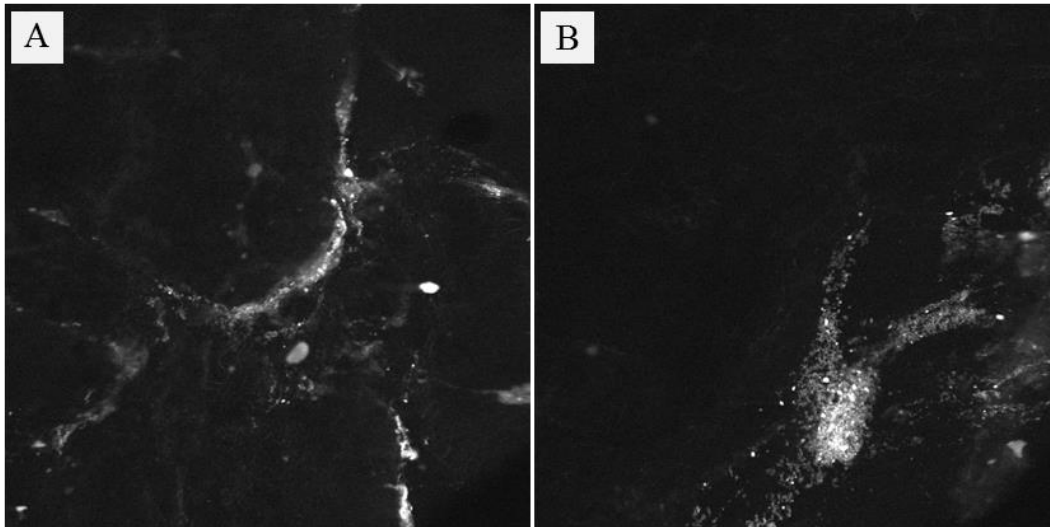


Abbildung 84: Endoskopische Aufnahmen von 25 nm SiO<sub>2</sub>-EGFR-Partikeln in A: Tumor- und B: Normalgewebe.

Abbildung 84 zeigt die endoskopischen Aufnahmen von Tumorgewebe (A) und Normalgewebe (B) mit 25 nm großen Silicapartikeln. In beiden Bildern ist eine deutliche Fluoreszenz der Partikel zu erkennen. Allerdings ist die Fluoreszenz weniger flächendeckend, sondern mehr „linear“. Es wird also vermutet, dass die Ablagerung der Partikel im Normalgewebe weniger durch eine tatsächliche Bindung der Partikel an die Zellen zustande kommt, sondern eher durch eine Ansammlung in den Zellzwischenräumen, die durch das leichte Abspülen mit der Kochsalzlösung nicht entfernt werden konnte.

Aus diesem Grund wurden dieselben Experimente nochmals mit größeren Partikeln durchgeführt. Diesmal kamen 45 nm große Partikel zum Einsatz, die ansonsten identisch zu den zuvor eingesetzten Partikeln waren.

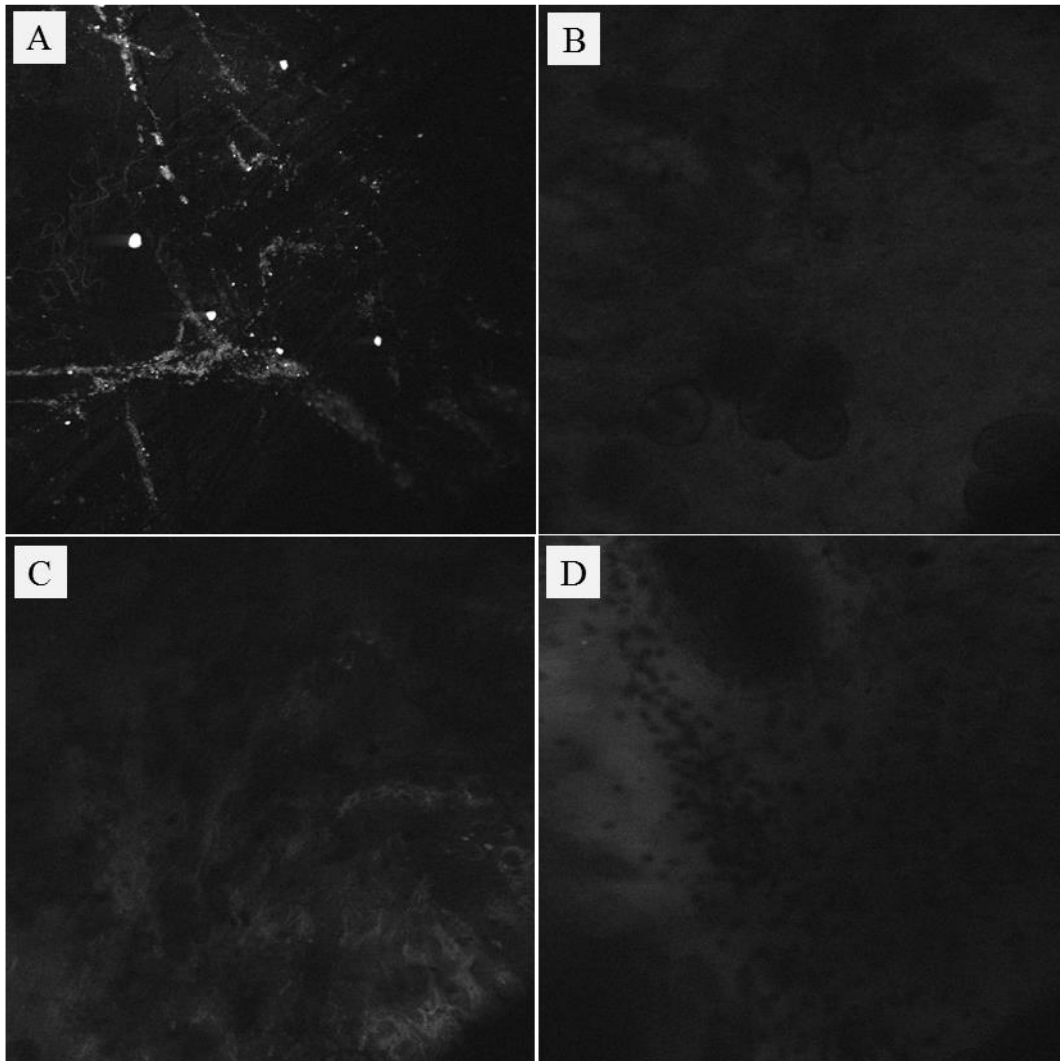


Abbildung 85: Endoskop-Aufnahmen von 45 nm SiO<sub>2</sub>-EGFR-Partikeln in A: Tumor-, B: Normalgewebe und 45 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln in C: Tumor-, D: Normalgewebe.

Abbildung 85 zeigt die endoskopischen Aufnahmen der 45 nm großen SiO<sub>2</sub>-Partikel. In Abbildung A (Tumor) und B (Normal) sind die Aufnahmen der anti-EGFR-Antikörper funktionalisierten SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel gezeigt. Hier ist sehr gut zu erkennen, dass bei der Tumorseite eine Fluoreszenz zu sehen ist, also Partikel vorhanden sind, was bei der Normalgewebeprobe nicht der Fall ist. In Abbildung C (Tumor) und D (Normal) sind nochmal zwei Negativkontrollen dargestellt, in denen die Gewebeprobe mit fluoreszenzmarkierten Partikeln, ohne anti-EGFR-Antikörper inkubiert wurden. Wie zu erwarten, sind in beiden

Fällen keine Partikel vorhanden, da ihnen der Anker zum Binden an das maligne Gewebe fehlt.

Nach der endoskopischen Untersuchung wurden von den Gewebeproben Dünnschnitte angefertigt. Diese Dünnschnitte, genau genommen die Zellkerne wurden mit Dapi (VECTASHIELD® Mounting Media mit Dapi, Vector Lab) angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Diese Aufnahmen sind in Abbildung 86 zu sehen.

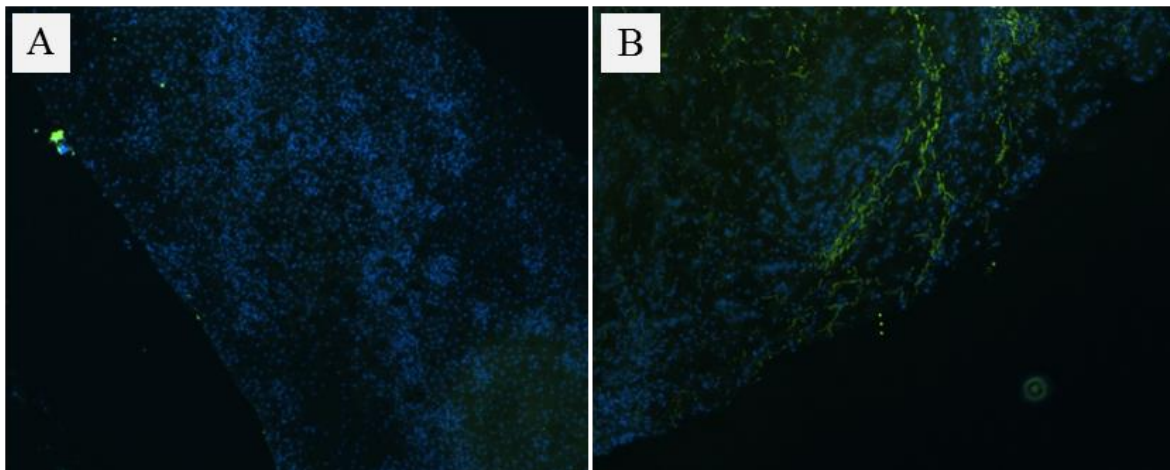


Abbildung 86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Tumordünnschnitten aus Abbildung 4. A: Normal und B: Tumor.

Abbildung A zeigt die Aufnahme eines Dünnschnittes von mit Partikeln inkubierten Normalgewebe. Es ist kaum eine grüne Fluoreszenz zu beobachten, es haben also nur sehr wenige Partikel gebunden, was durchaus möglich ist, da auch gesunde Zellen den EGF-Rezeptor exprimieren. In Abbildung B ist allerdings eine deutlich höhere Fluoreszenz zu erkennen, was für eine erhöhte Bindung der Nanopartikel spricht.

### **5.3 Zusammenfassung**

Es konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung des anti-EGFR-Antikörpers an fluoreszenzmarkierte SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel möglich ist und die Partikel damit fähig sind an Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen zu binden. Diese Bindung konnte zum einen in Fluoreszenzbildaufnahmen aus Einzelzellexperimenten beobachtet werden, und zum anderen in den endoskopischen Aufnahmen und den Fluoreszenzbildaufnahmen von Tumorgewebeproben bestätigt werden. Es ist für die Zukunft erstrebenswert eine flächendeckendere Markierung des malignen Gewebes zu erreichen um eine klare Abgrenzung des Tumors vom Normalgewebe zur Entfernung zu gewährleisten. Des Weiteren sollen weitere Tumorzelllinien und Karzinomgewebearten untersucht werden, um alle Plattenzellkarzinome aus dem Hals-Rachenbereich mit Hilfe dieser Methode markieren und anschließend behandeln zu können.





# Kapitel 6

## Einfluss von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln auf dendritische Zellen, Mastzellen und Makrophagen

### 6.1 Einführung und Theorie

In Kooperation mit der AG [REDACTED] und der AG [REDACTED], Universitätsmedizin Mainz sollte der Einfluss von Silicananopartikeln auf dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und Mastzellen untersucht werden. Hierzu sollte zunächst geklärt werden ob und über welchen Weg (Rezeptorbeteiligung) die Nanopartikel in die jeweilige Zelle aufgenommen werden.

#### 6.1.1 Grundlagen

Dendritische Zellen, Makrophagen und Mastzellen sind Teil der angeborenen und adaptiven Immunität und befinden sich hauptsächlich im Gewebe (Makrophagen und Mastzellen) bzw. in den sekundären lymphatischen Organen (DCs). Sie entstehen alle aus hämatopoetischen

Vorläuferzellen (siehe Abbildung 87).<sup>[40]</sup> Alle drei Zelltypen spielen eine große Rolle im Immunabwehrsystem.

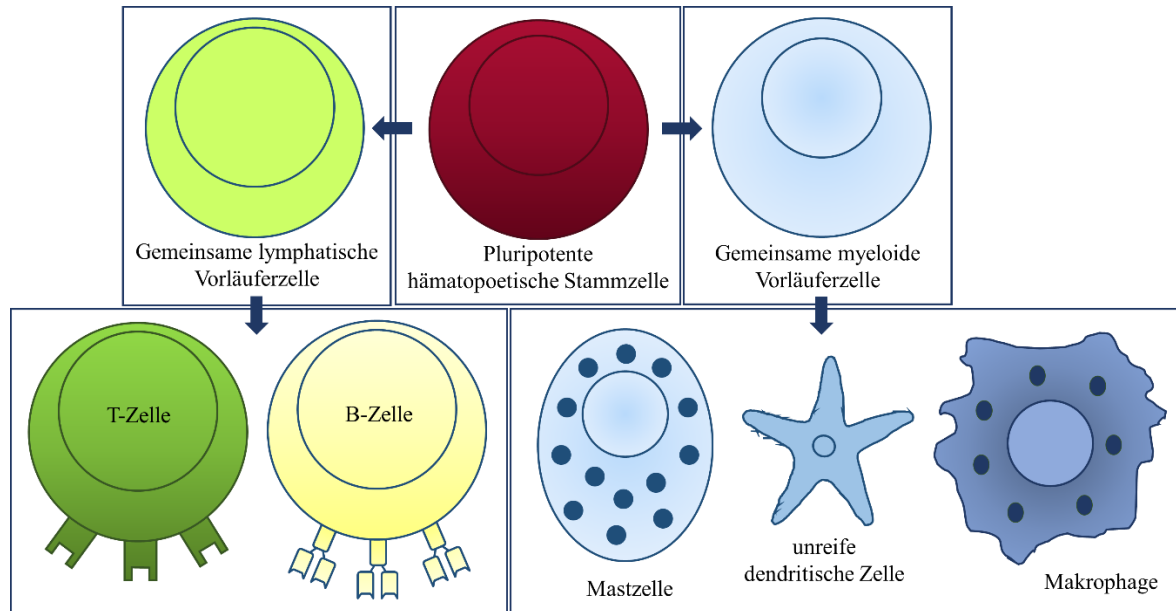


Abbildung 87: Schematische Darstellung eines Teils der zellulären Bestandteile des Blutes, ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark.<sup>[40]</sup> Keine maßstabsgetreue Darstellung der Zellen untereinander.

### 6.1.1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind verzweigte Zellen des angeborenen Immunsystems, deren hauptsächliche Aufgabe darin besteht, Antigene aufzunehmen und lymphoiden Zellen zur Erkennung zu präsentieren. Diese Präsentation kann sowohl für B-Zellen, als auch insbesondere für T-Zellen erfolgen. Für letztere stellen aktivierte DCs die stärksten Stimulatoren dar, um eine T-Zell-Reaktion auszulösen. Zunächst befinden sich unreife dendritische Zellen im Blut, und wandern dann ins Gewebe. Dort nehmen sie große Mengen an Substanzen aus der extrazellulären Umgebung auf (Makropinozytose, aber auch Phagozytose) um potentielle Antigene zu finden. Werden sie durch pathogenabgeleitete oder endogene Gefahrensignale aktiviert reifen sie zu reifen Zellen aus und wandern in drainierende Lymphknoten. Reife dendritische Zellen unterscheiden sich von unreifen DCs durch die verstärkte Expression verschiedener Oberflächenmoleküle. Diese kostimulierenden Moleküle sind zusammen mit dem auf ihrer Oberfläche präsentierten Antigen für die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen verantwortlich. Neben DCs besitzen vorwiegend nur noch die B-Zellen und Makrophagen diese Oberflächenmoleküle. Somit sind diese Zelltypen in der Lage eine Proliferation antigenspezifischer T-Zellen zu induzieren, wobei letztere zu T-Effektorzellen differenzieren. In Abbildung 88 ist die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen schematisch dargestellt. Aktivierte DCs synthetisieren vermehrt die sogenannten MHC-Moleküle, die für die Antigenpräsentation (zerlegte Peptidstücke des Antigens) verantwortlich sind. Zusätzlich exprimieren sie verstärkt kostimulierende Moleküle auf ihrer Oberfläche. Mit Hilfe beider Molekülklassen können sie naive T-Zellen aktivieren.

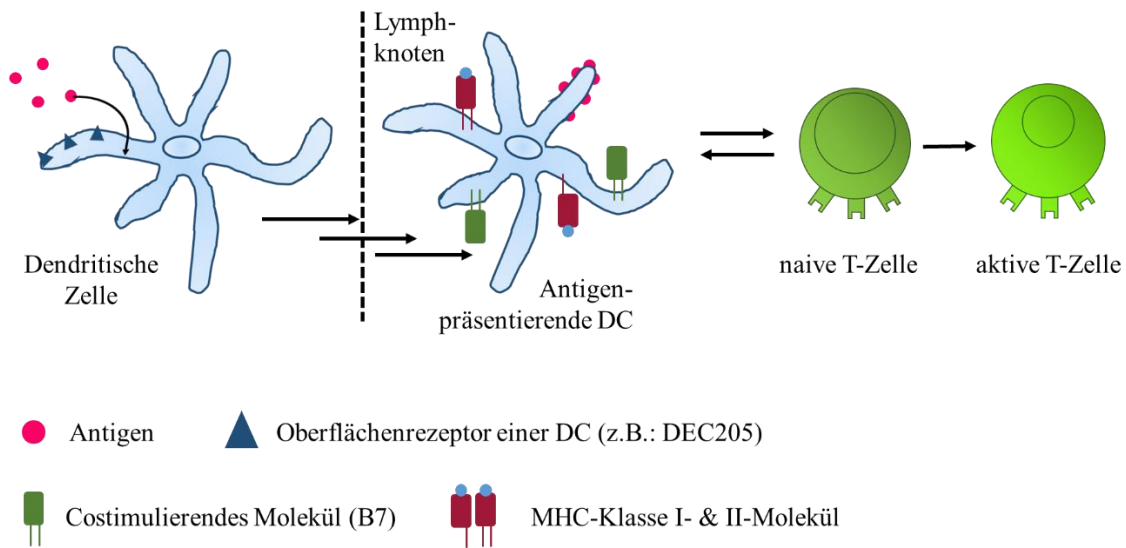


Abbildung 88: Schematische Darstellung einer T-Zell-Aktivierung von dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen besitzen im unreifen Zustand eine Vielzahl von weiteren Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die sehr wichtig für die Antigenaufnahme der Zellen sind. Hier sollen ein paar der wichtigsten Rezeptoren genannt werden, da später untersucht werden soll, inwiefern diese eine Rolle bei der potentiellen Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen spielen. In der folgenden Arbeit sollen die Effekte des Mannose-, DEC205-, CD209- und Dectin-1-Rezeptors untersucht werden. Die wichtigsten Eigenschaften dieser Rezeptoren und deren Klassifizierung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Eigenschaften und Klassifizierung der verschiedenen Rezeptoren. <sup>[40]</sup>

Rezeptor		Familie	Typ	Vorkommen	Funktion
Mannose	CD206, 175- 190 kDa	C-Typ Lectin	Transmembran- rezeptor Typ I	DC, Makrophagen, Endothelzellen	<b>Phagozytisch,</b> <b>Antigenerkennung</b> (PRR, engl.: <i>patogen recognition</i> <i>receptor</i> ) → Kohlenhydrat- erkennungsdomänen (CRD, engl.: <i>carbohydrate-</i> <i>recognition domain</i> )
DEC205	CD205, 205 kDa	C-Typ Lectin	Transmembran- rezeptor Typ I	DC, wenig auf Makrophagen und TC	<b>stark phagozytisch,</b> <b>Antigenerkennung</b>
DC-SIGN	CD209, 44 kDa	C-Typ Lectin	Transmembran- rezeptor Typ II	DC, Makrophagen	Mögliche Bindung des T- Zell-Rezeptors via ICAM-3
Dectin-1	CLEC7A	C-Typ Lectin	Transmembran- rezeptor Typ II	DC, BC, TC Neutrophile Zellen, Makrophagen	<b>Antigenerkennung</b> (PRR → CRD)
Scavenger	SR-A SR-BI HDL		Multipass Transmembran- rezeptor	Makrophagen, Leber	<b>Phagozytisch</b>
Fcγ				Phagozyten, BC, DC, NK- Zellen	<b>Bindet Fc-Domäne von</b> <b>IgG-Molekülen</b> <b>(Unterscheidung von</b> <b>gebundenem und freien</b> <b>AK möglich)</b>
MAC-1	CR3, 170 + 90 kDa	Leuko- zyten- integrin	Heterodimer aus CD11b und CD18		

Bei allen Rezeptoren handelt es sich um Transmembranrezeptoren; dies sind membrangängige Rezeptoren, die entweder einen (engl.: *single pass transmembrane receptor*) oder mehrere (engl.: *multipass transmembrane receptor*) Membrandurchgänge besitzen können. Bei ersterem wird der Typ I (N-Terminales Ende extrazellulär) vom Typ II (C-Terminales Ende extrazellulär) Rezeptor unterschieden.

#### **6.1.1.1 Makrophagen**

Makrophagen sind große, einkernige, phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie stammen ebenfalls von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und sind in der Lage, Antigene zu präsentieren oder direkt als Effektorzellen zu agieren. Sie differenzieren aus Monozyten im Blut und wandern dann in fast alle Gewebe ein. Dort können sie Pathogene sofort erkennen, ohne ihnen vorher schon einmal begegnet zu sein. Meistens sind Makrophagen auch die ersten Zellen die mit Pathogenen in Kontakt kommen, bis sie von weiteren Immunzellen bei der Abwehr unterstützt werden. Sie sind in der Lage, über die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen Entzündungen auszulösen (siehe Mastzellen) oder Pathogene direkt abzutöten (Phagozytose). Bei der Phagozytose handelt es sich um einen aktiven Vorgang, bei dem das betroffene Pathogen zunächst von der Zellmembran umhüllt und so in ein Vesikel, das sogenannte Phagosom aufgenommen, wird. Dieses Phagosom wird dann von der Zelle angesäuert und mit einem oder mehreren Lysosomen (Granula, die Enzyme und andere Mediatoren enthalten) verschmolzen. In dem entstandenen Phagolysosom wird das Pathogen zerstört.

Für eine mögliche Antigenpräsentation für die Lymphozyten müssen die Makrophagen, wie DCs zunächst MHC- und B7-Moleküle auf ihrer Oberfläche verstärkt exprimieren.

#### **6.1.1.2 Mastzellen**

Mastzellen halten sich hauptsächlich direkt unter der Haut und entlang von Blutgefäßen im Bindegewebe auf, sind aber auch im submucosalen Gewebe (Schleimhaut) zu finden. Es handelt sich hier um große exozytierende Zellen (20-30µm), die vor allem bei allergischen

Reaktionen beteiligt sind. Ihre charakteristischen Granula (körnchenförmige Einlagerung in der Zelle, die als Speicher dienen, Abbildung 89) im Zytoplasma der Zelle, enthalten verschiedene Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin. Sie exprimieren hoch affine Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (FcεRI), an die IgE-Antikörper binden können. Trifft ein multivalentes Antigen auf diese Antikörper, können letztere über ihren Fc-Anteil Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen kreuzvernetzen. Hierdurch werden die Zellen aktiviert und die Mastzell-Degranulation induziert. Hingegen ist ein monomeres Antigen nicht in der Lage die Mastzelle zu aktivieren (Abbildung 89). Die Degranulation bezeichnet die Freisetzung (Exozytose) der Granula und damit die Ausschüttung der in der Granula enthaltenen Substanzen. Diese Mediatoren führen dann zu einer lokalen oder systemischen Überempfindlichkeitsreaktion (Entzündungsreaktion) und zu einer erhöhten Durchblutung und Gefäßpermeabilität. Dadurch kommt es im umliegenden Gewebe zu einer Ansammlung von Flüssigkeit, Proteinen, Antikörpern und Zellen aus dem Blut. Herbeiströmende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen können dann die Antigene bzw. Pathogene angreifen. Mastzellen sind also langlebige Zellen, die in allen Geweben vorkommen, eine große Bandbreite an Mediatoren anbieten können und für ihre schnelle Degranulation dieser bekannt sind. <sup>[105]</sup>

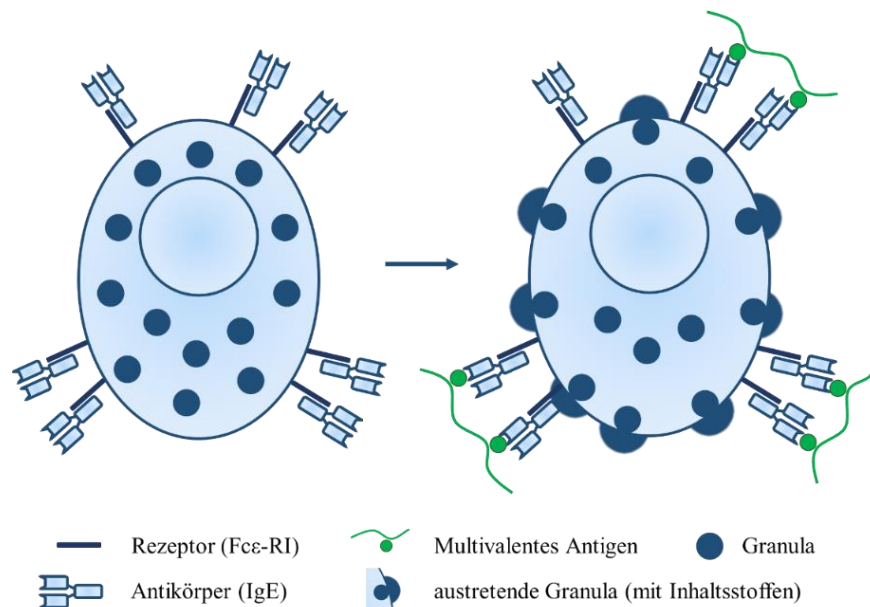


Abbildung 89: Schematische Darstellung einer Mastzellen-Aktivierung.

### 6.1.1.3 Modellantigen

In dieser Arbeit kommt das Protein Ovalbumin (Hauptbestandteil des Hühnereiweißes) als Modellantigen zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Protein der Serpin-Familie. Serpine sind Proteine die in allen Lebewesen vorkommen, sich strukturell sehr ähneln, jedoch unterschiedliche Funktionen besitzen können.<sup>[106], [107]</sup> Alle Serpine, auch Ovalbumin sind aus drei  $\beta$ -Faltblättern und neun  $\alpha$ -Helices aufgebaut.

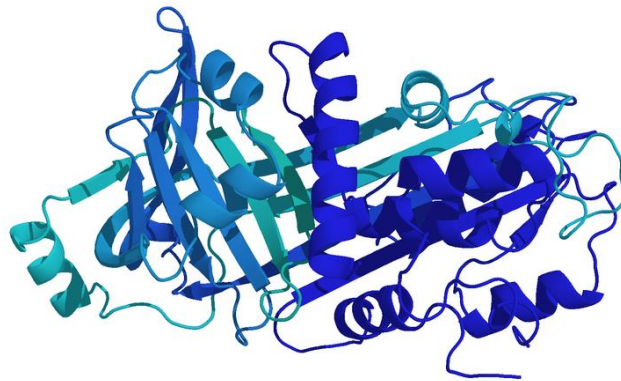


Abbildung 90: 3D-Struktur eines Ovalbumin-Proteins.<sup>[108]</sup>

Ovalbumin dient in der Immunologie oft als Modellantigen, welches leicht von dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert werden kann. Hierbei wird oft nicht das ganze Protein verwendet, sondern lediglich Peptidsequenzen, wie „Gray Peptide“ und „SIINFEKL“ (Abbildung 91).

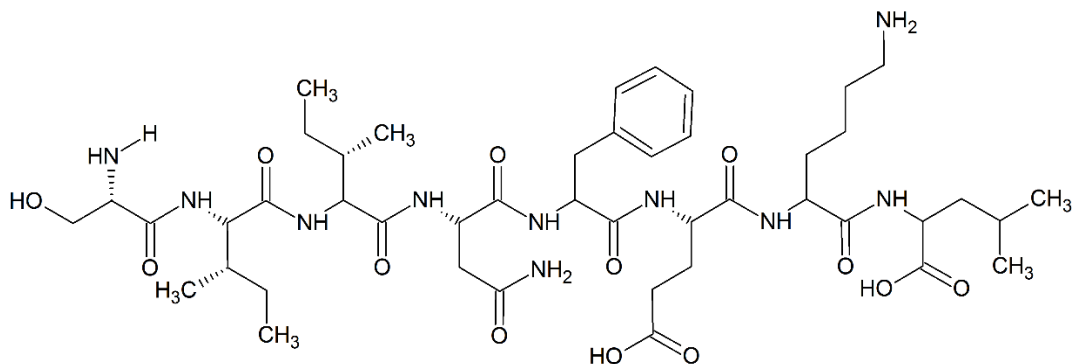


Abbildung 91: Strukturformel des "SIINFEKL" OVA-Peptidabschnitts.



### **Ovalbumin DQ™**

OVA-DQ™ ist ein selbst quenches Ovalbumin-Farbstoff-Konjugat. Bei dem nicht pH-sensitiven Farbstoff handelt es sich um BODIPY®. Dieser Farbstoff wird von dem OVA-Protein gequenchet und zeigt somit im „Normalzustand“ keinerlei Fluoreszenz. Wird das Protein von Zellen aufgenommen, findet ein proteolytischer Abbau des Ovalbumin statt, was den quencheden Effekt aufhebt. Der Farbstoff fluoresziert nun grün. Verbleibt er in der Zelle und sammelt sich dort an (Akkumulation) findet eine Verschiebung der Absorption in den roten Bereich statt. OVA-DQ™ wurde für den Nachweis der Antigenprozessierung in Zellen entwickelt. [109], [110]

#### **6.1.1.4 FACS**

Die Durchflusszytometrie („FACS“, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) ist ein Zellmessverfahren, welches hauptsächlich in der Biologie und der Biomedizin zum Einsatz kommt. Hierbei werden einzelne Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit an einem Lichtstrahl vorbei geführt. Dabei können die Größe und Granularität der Zellen und unter Verwendung spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper die Expression von Proteinen analysiert werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometrie werden die Zellen aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzfärbungen sortiert. Findet zum Beispiel eine Aufnahme/Bindung von, mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff markierten Nanopartikeln in die Zellen statt, sind diese Zellen zusätzlich fluoreszenzmarkiert. Eine mögliche graphische Darstellung der Analyseergebnisse ist ein 2D-Diagramm, in dem die Zellen mit unterschiedlicher Fluoreszenz in unterschiedlichen Bereichen aufgetragen werden. So kann ein prozentualer Anteil an zum Beispiel „FITC-positiven“-Zellen (Zellen die FITC markierte Nanopartikel enthalten) bestimmt werden. Hierbei wird dann zum Beispiel auf der X-Achse die (zelluläre) Fluoreszenzintensität aufgetragen und auf der Y-Achse die Zellzahl (Abbildung 92).

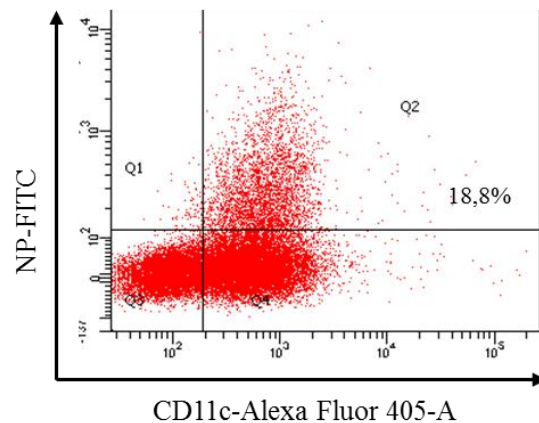


Abbildung 92: FACS-Aufnahme von dendritischen Zellen, die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Silicananopartikeln inkubiert wurden.

#### 6.1.1.5 Aufgabe

Um eine gezielte Ansteuerung von Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen mit Silicananopartikeln zu ermöglichen, muss zunächst untersucht werden, ob und wie die reinen Partikel von den drei verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden. Dazu sollen zunächst die Mechanismen zur Aufnahme von Silicananopartikeln in die Zellen verstanden werden, bevor eine spezifische Ansteuerung mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt werden kann. Hierzu sollen verschieden große SiO<sub>2</sub>-Partikel (nur mit einem Farbstoff gelabelt) unter verschiedenen Bedingungen mit Mastzellen, Makrophagen und dendritische Zellen inkubiert und deren Effekt auf die Zellen beobachtet werden.

## 6.2 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FITC}$ -Nanopartikel im Größenbereich von 25 – 100 nm unter verschiedenen Bedingungen mit Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen inkubiert. In einem ersten Schritt wurde anhand einer FACS-Analyse ermittelt, wie viele Zellen Partikel gebunden bzw. aufgenommen haben. Anhand der FACS-Analysen kann nicht von einer Bindung oder Aufnahme unterschieden werden. Im weiteren Verlauf wird meist von einer Aufnahme geschrieben, dabei ist jedoch immer die Bindung oder Aufnahme gemeint. Anschließend wurden CLSM-Aufnahmen von den Zellen angefertigt, um eine eventuelle zelluläre Aufnahme der Partikel nachweisen zu können. Zusätzlich wurden verschiedene Aufnahmemechanismen der Zellen oder Reaktionen der Zellen auf die Partikel beobachtet. Als erstes wird auf die Ergebnisse zu den Mastzell-Inkubationen eingegangen. Anschließend folgen die Ergebnisse der Versuche mit den dendritischen Zellen und den Makrophagen.

### 6.2.1 Mastzellen

Die Mastzell-Experimente wurden von [REDACTED], AG [REDACTED], Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Für die Versuche wurden *bone marrow-derived* Mastzellen (BMMCs) verwendet. Um die Frage zu klären, ob die Silicananopartikel von diesen Zellen aufgenommen werden und ob sie eine zytotoxische Wirkung haben, wurden verschieden große Partikel, unter unterschiedlichen Bedingungen mit den Zellen präinkubiert.

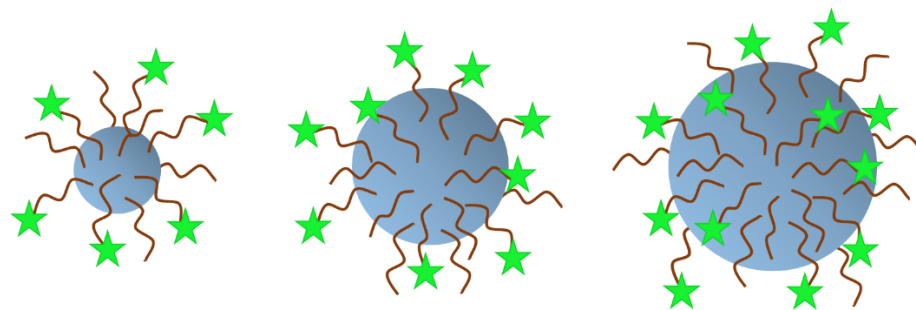


Abbildung 93: Schematische Darstellung von 25, 45 und 60 nm großen  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FITC}$ -Partikeln. Mastzellen sind im Vergleich dazu ca. 1000-fach größer.

Dazu wurden jeweils 100 µg/mL von 25, 45 und 60 nm großen Partikeln bei 4°C mit Serum präinkubiert und anschließend wurden die Partikel jeweils mit und ohne Serum bei 4°C und 37°C mit den Mastzellen inkubiert. Die Serumpräinkubation kann zur Bildung einer Proteinkorona um die Partikel führen, welche die Oberfläche der Partikel und die Gesamtgröße verändert. Dies kann zu einer veränderten Aufnahme/Bindung der Partikel von Zellen führen. Da bei *in vivo* Versuchen solch eine Adhäsion von Serumproteinen erfolgt, soll dieser Effekt bereits *in vitro* untersucht werden.

Nach drei Stunden Inkubationszeit mit den Mastzellen erfolgte die Analyse per FACS. Im Folgenden wird die FACS-Analyse von den größten Partikeln (60 nm) bei 4°C bzw. 37°C exemplarisch dargestellt (Abbildung 94, oben). Die restlichen Daten, inklusive der Versuche mit 60 nm Partikeln wurden in zwei Balkendiagrammen (Abbildung 94, unten) zusammengefasst.

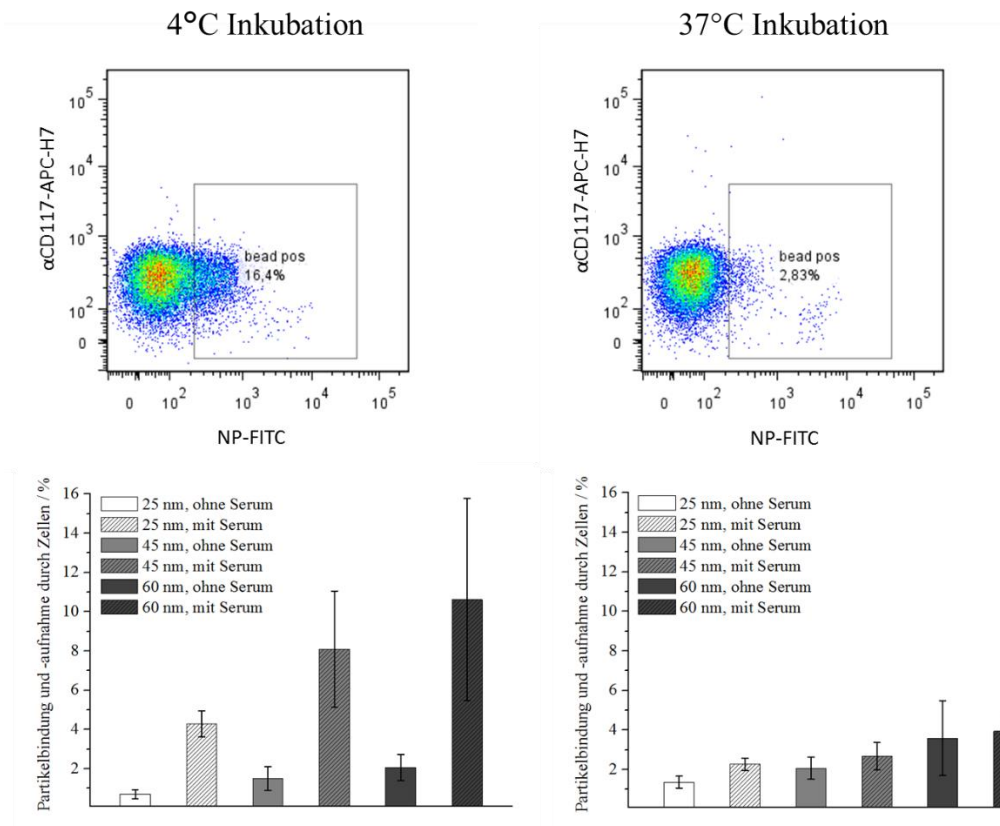


Abbildung 94: A: Diagramm der FACS-Analyse von 60 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln, bei 4°C und 37°C und B: zusammengefasste Darstellung aller Daten in zwei Balkendiagrammen. Die Daten werden aus dem Anteil von FITC-positiven Mastzellen berechnet.

Es kann eine größenabhängige Bindung/Aufnahme der Partikel beobachtet werden, wobei die Aufnahme für die größten Partikel tendenziell auch am größten ist. Des Weiteren liegt eine erhöhte Aufnahme der Partikel vor, wenn diese mit Serum präinkubiert wurden. Dieser Effekt ist besonders bei der Inkubation bei 4°C zu beobachten. Hier findet durch das Serum eine deutlich erhöhte Aufnahme der Partikel im Vergleich zu 37°C statt, was eher ungewöhnlich ist. Eigentlich wäre eine deutlich höhere Aufnahme der Partikel bei einer Inkubationstemperatur von 37°C zu erwarten, da eine aktive Aufnahme der Partikel durch die Zellen erwartet wird. Ein aktiver Aufnahmemechanismus kann jedoch bei 4°C nicht stattfinden. Da über die FACS-Analyse nicht geklärt werden kann, ob die Partikel wirklich von den Zellen aufgenommen worden sind oder nur an der Zellmembran adhärirt haben, wurden zusätzlich CLSM-Aufnahmen von den Zellen mit den Partikeln durchgeführt. Hierzu wurden 3D-Aufnahmen angefertigt, die aus mehreren Schnittbildern (Z-Ebenen, siehe Abbildung 95) berechnet wurden, um die Silicananopartikel in der Zelle genau lokalisieren zu können.

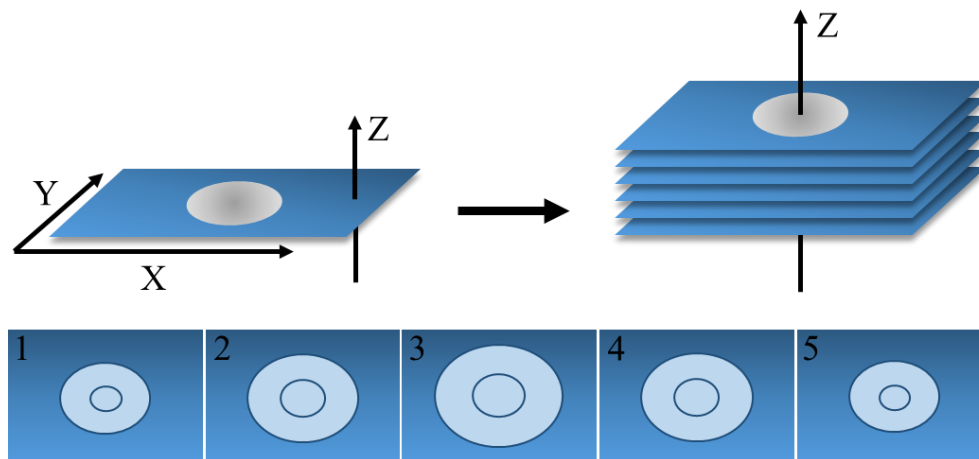


Abbildung 95: Schematische Darstellung einer 3D-Berechnung über die Z-Ebenen Aufnahmen im CLSM.

Für die folgenden Versuche wurden die kleinsten und größten Silicananopartikel, wieder bei 4°C und 37°C, mit und ohne Serum mit den Mastzellen für drei Stunden inkubiert. Die Zellmembran wurde dann mit CellMask™ Deep Red (unspezifischer Membran-Farbstoff) angefärbt. So können sowohl die Zellen (rot), als auch die Nanopartikel (grün) im CLSM lokalisiert werden.

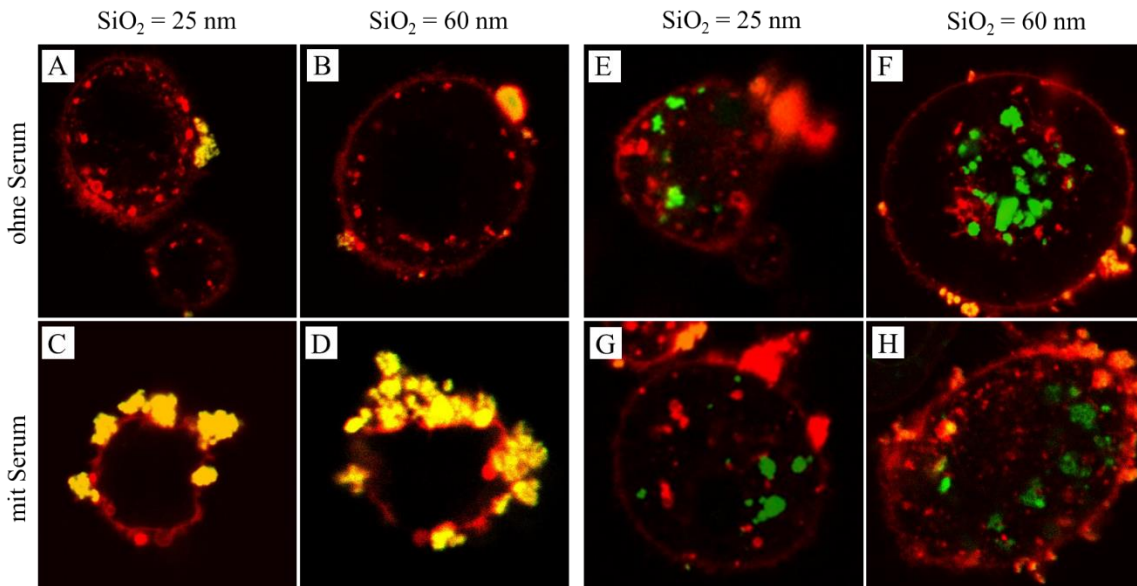


Abbildung 96: CLSM-Aufnahmen von 25 und 60 nm Silicapartikeln, mit und ohne Serum, bei 4°C und 37°C in Mastzellen. Rot: Zellmembran (CellMask™ Deep Red), grün: Partikel (FITC).

In den CLSM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass bei 4°C (Abbildung 96, A-D) lediglich eine Anlagerung der Partikel an die Zellmembran stattfindet, jedoch fast keine Aufnahme. Zusätzlich führt die Präinkubation mit Serum bei 4°C zu einer erhöhten Agglomeration (C und D) der Nanopartikel, was das sehr hohe FITC-positive Signal in der FACS-Analyse erklärt. Bei den CLSM-Aufnahmen der 37°C Inkubation (E-H) können die Partikel sehr gut innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Hier fand somit eine Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen statt. Um dies zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 97 einige Schnittbilder (Z-Ebenen) zusammengestellt. Zusammen gerechnet ergeben diese Aufnahmen eine 3D-Darstellung einer Zelle, in der eine genaue Lokalisation der Partikel möglich ist.

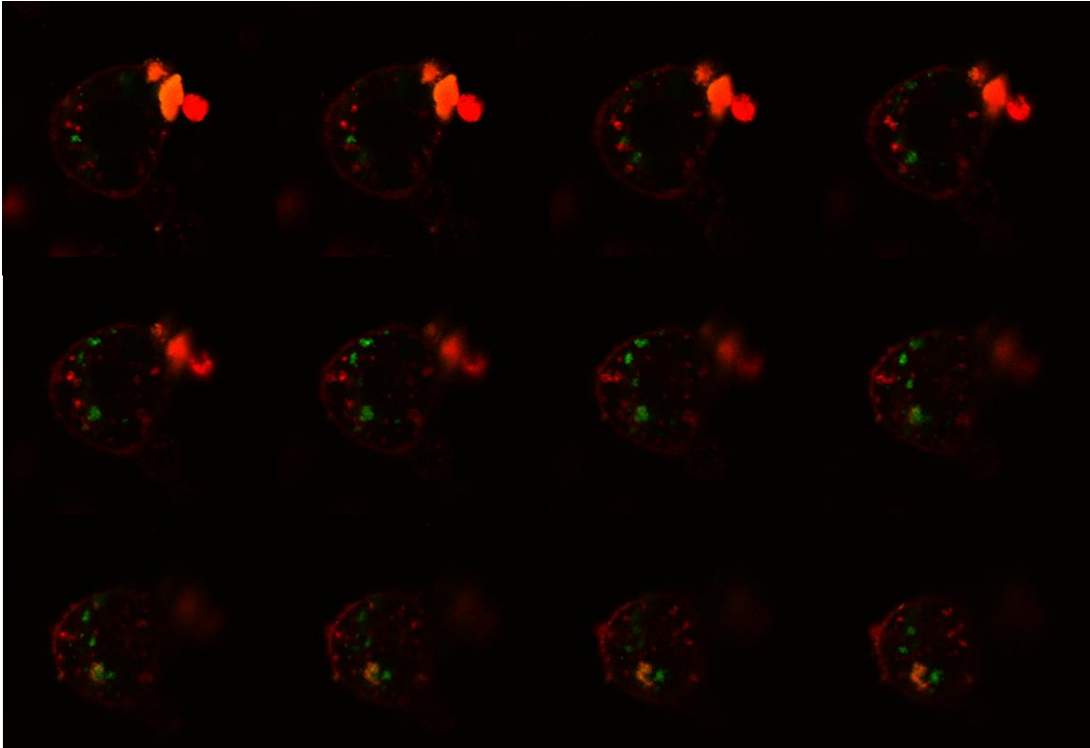


Abbildung 97: Z-Ebenen CLSM-Aufnahmen einer Mastzelle mit 25 nm Silicapartikeln bei 37°C (ohne Serum).

Die zwölf Schnittbilder (in Z-Richtung) durchlaufen einmal eine Mastzelle. Da in jeder Aufnahme Nanopartikel in der Zellmitte zu finden sind, müssen sich diese im inneren der Zelle befinden. Im Gegensatz dazu wurde in Abbildung 98 eine Schnittbildreihe einer 4°C Inkubation dargestellt.

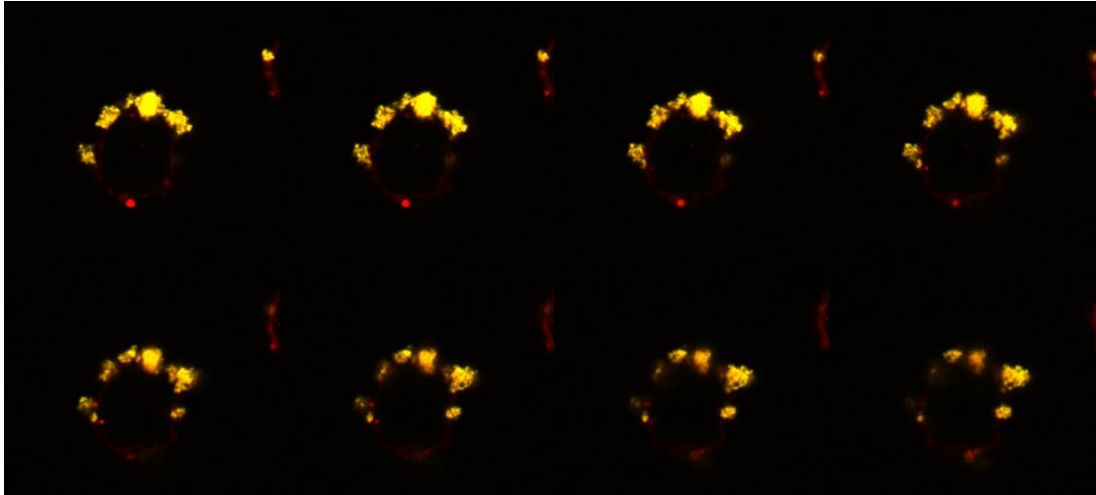


Abbildung 98: Z-Ebenen CLSM-Aufnahmen einer Mastzelle mit 25 nm Silicapartikeln bei 4°C (mit Serum).

Hier können zu keinem Zeitpunkt Nanopartikel innerhalb der Zelle lokalisiert werden, so dass gesagt werden kann, die Mastzellen nehmen bei 4°C tatsächlich keine Partikel auf. Es findet lediglich eine Bindung an die Zellmembran statt.

### 6.2.1.1 Weitere Ergebnisse und Ausblick

Für weitere Ergebnisse, unter Verwendung von naiven Mastzellen und Silicananopartikeln soll auf die Masterarbeit von [REDACTED] verwiesen werden. Es wurden unter anderem Versuche zu der Degranulation der Zellen gemacht, wobei es darum ging, ob die Nanopartikel einen Einfluss auf diese haben.

Des Weiteren soll der genaue Weg der Nanopartikel durch eine spezielle Markierung dieser untersucht werden. Hier geht es vor allem darum, ob die Partikel zum Beispiel nach einer Aufnahme in die Zelle, dort verbleiben oder diese wieder verlassen und was dann danach passiert. Hierzu sollen die Partikel mit OVA-DQ<sup>TM</sup> umgesetzt werden. Zusätzlich sollen die Partikel selbst noch mit einem weiteren Farbstoff (Absorption in einem anderen Kanal, z.B. blau) funktionalisiert werden um deren Aufenthaltsort auch nach der Prozessierung noch bestimmen zu können. Über diese spezielle Funktionalisierung der Silicapartikel kann also beobachtet werden, ob diese nach einer Zellaufnahme in der Zelle verbleiben oder nach einiger



Zeit wieder ausgeschleust werden. Hierzu wurden bereits erste Versuche durchgeführt ob Mastzellen überhaupt OVA-DQ<sup>TM</sup> aufnehmen, prozessieren und akkumulieren können. Sind diese Versuche erfolgreich abgeschlossen, sollen die Nanopartikel mit OVA-DQ<sup>TM</sup> markiert und in Zellexperimenten verfolgt werden.

## 6.2.2 Dendritische Zellen

Folgende Arbeiten wurden von [REDACTED] und [REDACTED], AG [REDACTED], Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Für die Versuche kamen BMDCs (engl.: *bone marrow-derived dendritic cells*) zum Einsatz, die im Weiteren nur noch als dendritische Zellen oder DCs bezeichnet werden. Es sollte die Frage geklärt werden, ob und über welche Wege nicht funktionalisierte Silicananopartikel von dendritischen Zellen aufgenommen werden.

### 6.2.2.1 Aufnahme der Partikel in Zellen

Um die Frage zu klären ob die Silicananopartikel von dendritischen Zellen aufgenommen werden, wurden diese zunächst mit BMDCs unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und im FACS analysiert. Dazu wurden 25, 45, 60 und 100 nm große fluoreszenzmarkierte SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC-Partikel, in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

In Gegenwart von Serumproteinen kann sich eine Proteinkorona um die Nanopartikel bilden (siehe Kapitel 2), welche die Oberfläche der Partikel verändert und somit deren Bindung/Aufnahme beeinflussen kann. Um einen möglichen Einfluss von Serum auf die Aufnahme der Partikel zu ermitteln, wurden diese daher mit und ohne Serum präinkubiert und erst danach zu den Zellen gegeben. Die Präinkubation erfolgte mit Mausserum (NP:Serum – 1:1) für 1 h bei 37°C. Über eine FACS-Analyse konnte dann die zelluläre Interaktion der Partikel ermittelt und in Abbildung 99 aufgetragen werden.

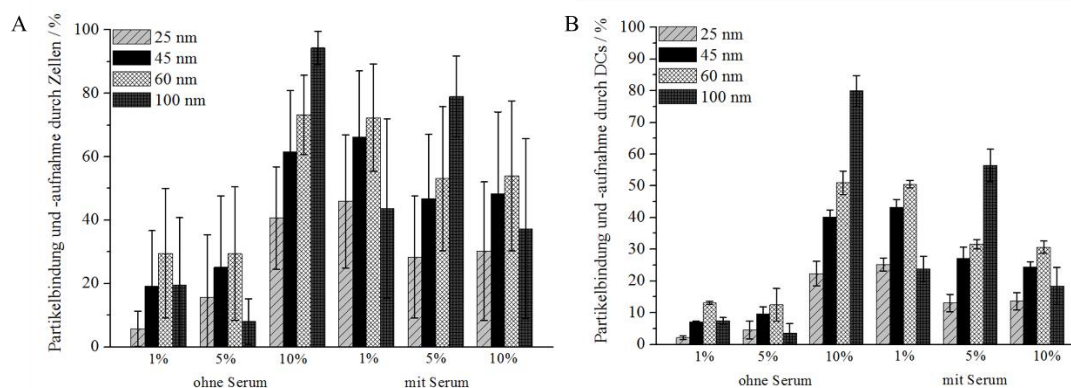


Abbildung 99: A: Partikelaufnahme von der Gesamtzellpopulation (alle aus dem Knochenmark generierten Zellen) und B: Partikelaufnahme der dendritischen Zellen (CD11c+). Untersuchung unterschiedlicher Partikelkonzentrationen und -größen mit und ohne Serumpräinkubation.

In Abbildung 99 A ist zu sehen, wie viel Prozent aller aktivierten BMDCs die Nanopartikel aufgenommen haben, wohingegen Abbildung B zeigt wie viel Prozent der dendritischen Zellen die Nanopartikel aufgenommen haben. Je höher die Konzentration der Partikel war, desto größer war die Aufnahme. Zusätzlich ist eine partikelgrößenabhängige Intensität der zellulären Aufnahme zu beobachten, bei der die größten Partikel (100 nm) von nahezu allen Zellen aufgenommen wurden. Nach der Präinkubation mit Serum, kann teilweise eine verminderte und teilweise eine erhöhte Aufnahme beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mit Serum durchgeführt. Hierzu wurde wieder ein Teil der Partikel mit Serum präinkubiert und bei verschiedenen Temperaturen zu den Zellen gegeben. Dadurch sollte ein möglicher Temperatureinfluss der Partikel-/Zellinteraktion untersucht werden. Es erfolgte somit eine Inkubation mit und ohne Serum, bei 4°C und 37°C, mit einer Partikelkonzentration von 5 Vol.-%. Die Partikelbindung/-aufnahme wurde nach drei, sechs und 24 Stunden im FACS untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 100 dargestellt.

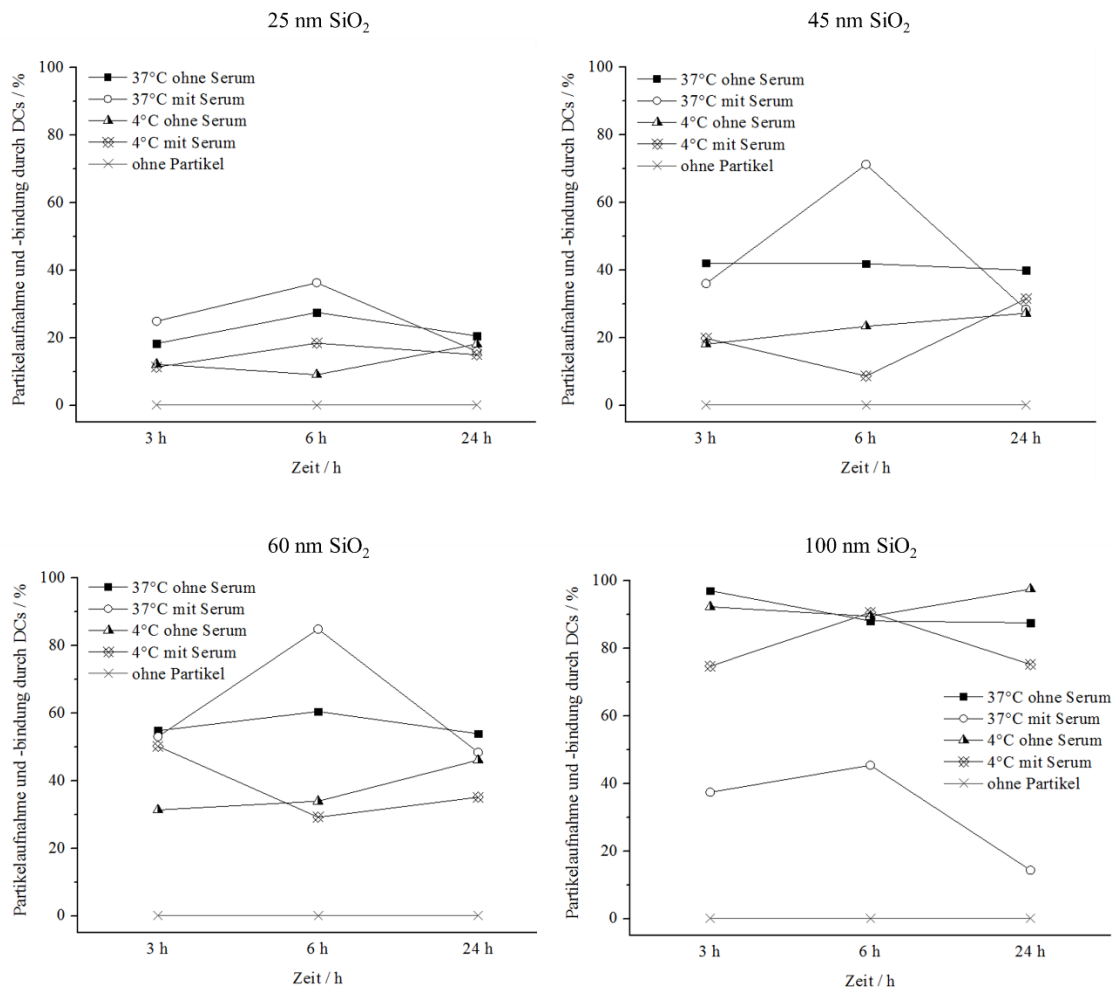


Abbildung 100: FACS-Analyse der Partikelaufnahme (25, 45, 60 und 100 nm) in BMDCs (CD11c+) bei 4 und 37°C, mit und ohne Serum nach 3, 6 und 24 h.

Silicapartikel, welche nicht mit Serum präinkubiert wurden, führten nach 24 h bei 37°C zu einer höheren Aufnahme als bei 4°C (mit Ausnahme der 100 nm Partikel). Dieses Ergebnis bestätigt die zu erwartende aktive Aufnahme der Partikel in die Zellen. Bei einer Präinkubation der Partikel mit Serum zeigt sich allerdings ein umgekehrter Trend. Hier ist die Aufnahme bei 4°C immer am höchsten (mit Ausnahme der 60 nm Partikel). Da mit der FACS-Analyse jedoch nicht unterschieden werden kann, ob die Partikel tatsächlich aufgenommen wurden oder nur an die Zellen binden, kann keine eindeutige Aussage anhand dieser Daten getroffen werden. Um also zu klären, ob im letzteren Fall tatsächlich eine höhere Aufnahme bei

niedrigeren Temperaturen stattgefunden hat, wurden zusätzlich Fluoreszenzbildaufnahmen der Zellen mit den Partikeln angefertigt. Hierzu wurde ein konfokales Laser-Rastermikroskop (CLSM) verwendet, was die Untersuchung einzelner Zellen ermöglicht. Für die Aufnahmen wurden die kleinsten (25 nm) und die größten (100 nm) SiO<sub>2</sub>-Partikel bei 4°C und 37°C, mit und ohne Serumpräinkubation mit den BMDCs inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h, wurden die Zellkerne mit Dapi angefärbt und die Zellen fixiert. Kurz bevor die Aufnahmen angefertigt wurden, wurden die Zellmembran mit CellMask™ Orange angefärbt. Abbildung 101 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen nach einer Koinkubation mit 25 nm und 100 nm Partikeln (ohne Serumpräinkubation) bei 4°C und 37°C.

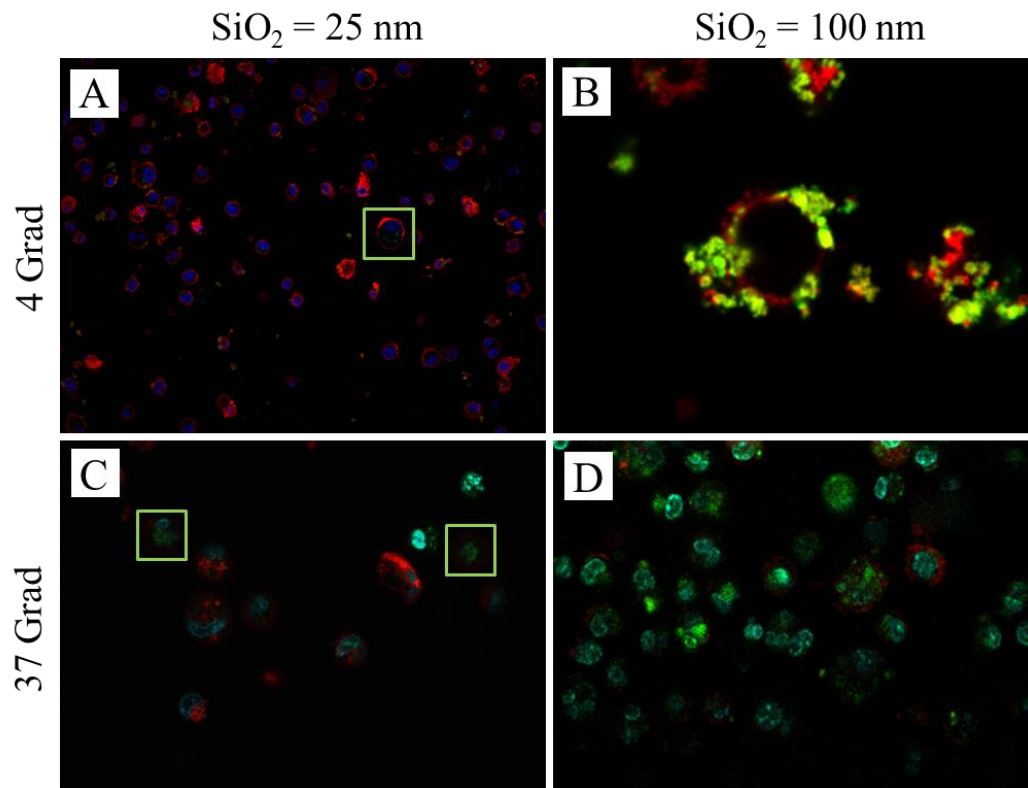


Abbildung 101: CLSM-Aufnahmen von A, C: 25 nm und B, D: 100 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit BMDCs. Inkubation bei A, B: 4°C und C, D: 37°C ohne Serumpräinkubation. Zellkern: blau (Dapi), Zellmembran: orange (CellMask™ Orange), Partikel: grün (FITC).

Die kleinen Partikel wurden nur von wenigen Zellen aufgenommen (grüne Kästchen, nicht alle „positive“ Zellen wurden markiert). Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit den FACS-

Analysen. Die FACS-Daten der 100 nm Partikel zeigten eine Aufnahme/Bindung der Partikel durch nahezu alle Zellen. Hier wird in den CLSM-Aufnahmen jedoch deutlich, dass bei 4°C keine Aufnahme stattgefunden hat. Die Partikel befinden sich hauptsächlich in Aggregaten auf der Zelloberfläche. Bei 37°C sind wiederum nahezu alle Partikel aufgenommen worden. Dieses Ergebnis unterstützt die erwartete aktive Aufnahme der Partikel durch dendritische Zellen. In Abbildung 102 sind die CLSM-Aufnahmen der Partikel gezeigt, die vor der Zugabe zu den Zellen mit Serum präinkubiert wurden.

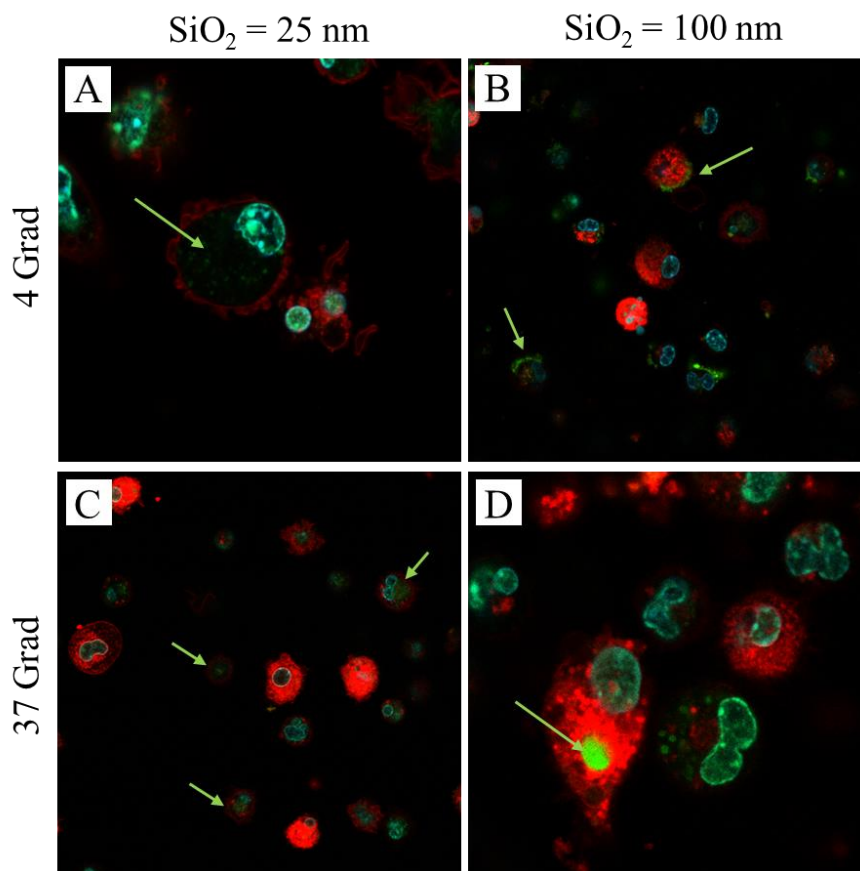


Abbildung 102: CLSM-Aufnahmen von 25 nm und 100 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit BMDCs. Inkubation bei 4°C und 37°C mit Serum.

Bei der Präinkubation der Partikel mit Serum wurden die kleinen Partikel von einem Teil der Zellen aufgenommen, wobei in diesen Aufnahmen kein Temperaturunterschied festzustellen ist. Auch diese Ergebnisse decken sich sehr gut mit den vorherigen FACS-Analysen. Die CLSM-Aufnahme der großen Partikel bei 4°C zeigt teilweise aufgenommene und teilweise an

der Zelloberfläche gebundene Partikel. Es ist zu erkennen, dass nahezu alle Zellen Partikel enthalten, was die vorherige FACS-Analyse bestätigen kann. Es kann jedoch keine genaue Aussage über den Anteil der Aufnahme gemacht werden. Bei der 37°C CLSM-Aufnahme der großen Partikel, sind große Agglomerate (große grüne Bereiche) zu erkennen, die an manchen Zellen zu adhären scheinen. Diese Bilder bestätigen die Vermutung einer starken Agglomeration der Partikel, was bereits optisch nach der Serumpräinkubation zu erkennen war.

### **6.2.2.2 Einfluss der Nanopartikel auf den Reifeprozess der DCs**

Nachdem gezeigt wurde, dass die verschiedenen Nanopartikel größenabhängig unterschiedlich von den BMDCs aufgenommen werden können, soll gezeigt werden, ob diese Partikel einen Einfluss auf die Reifung von dendritischen Zellen besitzen (Abbildung 103). Wie bereits in Kapitel 6.1.1.1 beschrieben sind die dendritischen Zellen im Gewebe zunächst „unreif“. Erst nach der Bindung/Aufnahme eines Stimulus reifen sie aus.

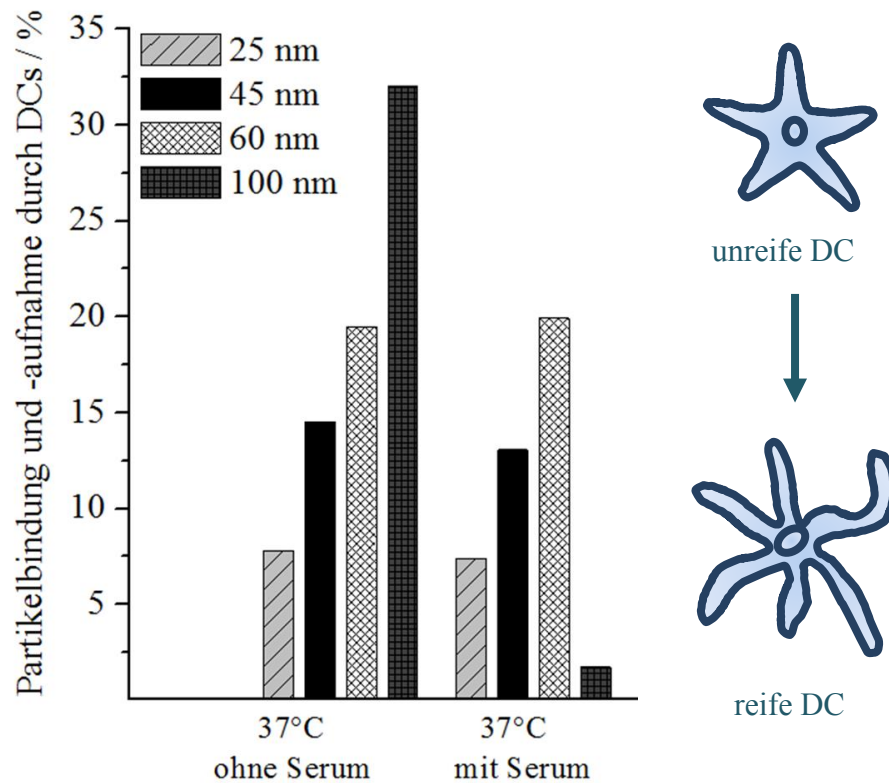


Abbildung 103: Beeinflussung des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen durch die Silicananopartikel.

Alle Partikel stimulieren die dendritischen Zellen, allerdings unterschiedlich stark. Je größer die Partikel, desto stärker ist der Effekt. Der starke Einbruch der 100 nm großen, serumpräinkubierten Partikel ist möglicherweise auf die Agglomeratbildung zurückzuführen.

### 6.2.2.3 Einfluss der Nanopartikel auf die Antigenaufnahme von dendritischen Zellen

Es ist von großem Interesse zu untersuchen, ob Nanopartikel die Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen beeinflussen. Für diese Versuche wurden OVA und die zuvor getesteten Silicananopartikel verwendet. Die Inkubation der BMDCs mit den Nanopartikeln erfolgte bei 37°C. Anschließend wurde den Zellen zusätzlich fluoreszenzmarkiertes OVA (OVA-Alexa Fluor® 647) zugegeben und bei 4°C und 37°C inkubiert. Nach verschiedenen

Zeiträumen (10, 30 und 60 Minuten) wurde die Frequenz OVA-bindender BMDCs untersucht. Für die verschiedenen Größen der Nanopartikel konnte kein signifikanter Einfluss auf die zeitabhängig zunehmende Antigenaufnahme in die Zellen bei 37°C festgestellt werden.

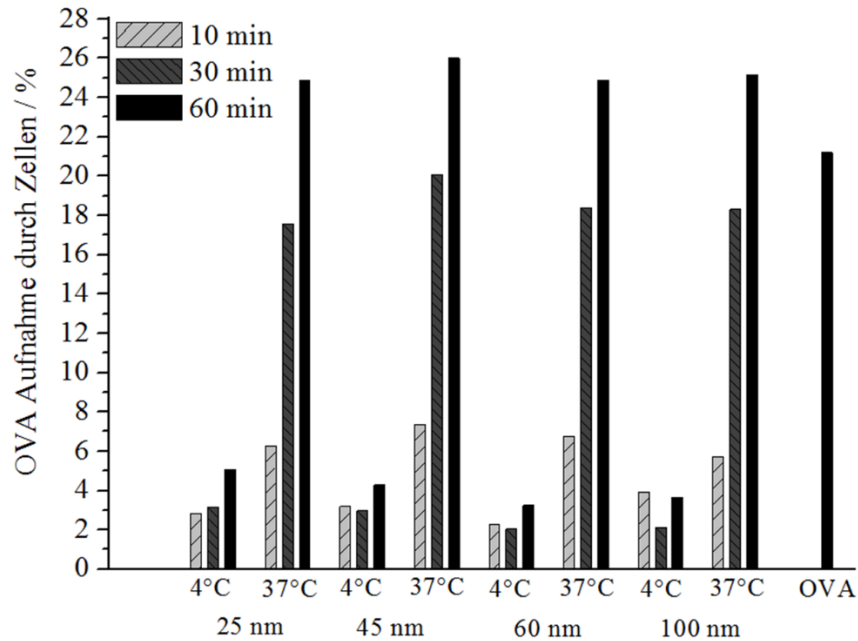


Abbildung 104: Antigenaufnahme der Zellen (Gesamtzellpopulation) nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.

#### 6.2.2.4 Einfluss von Ovalbumin auf die Partikelaufnahme der Zellen

Da die Partikel für spätere Anwendungen zum Beispiel mit Antigenen und Stimuli funktionalisiert werden sollen, muss der Einfluss dieser auf die Partikelaufnahme in die Zellen geklärt werden. Daher wurde erneut die Partikelaufnahme in die Zellen betrachtet, allerdings in Anwesenheit des bereits verwendeten Modellantigens OVA. Hierzu wurden die DCs im ersten Fall zuerst mit OVA und nach 3 h mit Partikeln und im zweiten Fall zuerst mit Partikeln und nach 3 h mit Ovalbumin inkubiert. Im Vergleich dazu erfolgte die Inkubation von Partikeln gänzlich ohne OVA.



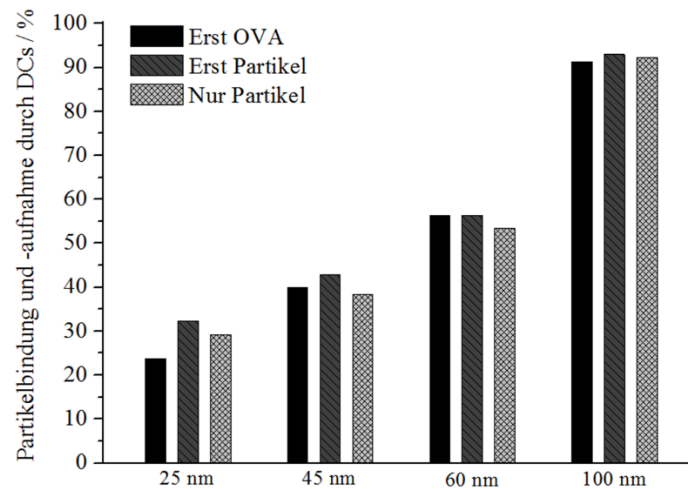


Abbildung 105: Einfluss von Ovalbumin auf die Partikelaufnahme.

Auch hier ist eine größenabhängige Aufnahme der Partikel zu beobachten, wobei das Ovalbumin bei den 100 nm großen Partikeln zu einer besseren Aufnahme führt und bei den 25 nm Partikeln zu einer schlechteren, im Vergleich zu den Partikeln alleine. Die Reihenfolge der OVA-Zugabe scheint dabei keine Rolle zu spielen.

### 6.2.2.5 Rezeptorabhängige Aufnahme der Nanopartikel

Wie bereits in Kapitel 2 und 6.1.1.1 beschrieben wurde, exprimieren verschiedene Zellen spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Nanopartikel sind dazu in der Lage an diese Rezeptoren zu binden, die eigentlich der Erkennung von Pathogenen bzw. endogenen Gefahrensignalen dienen. Sie können daher von den Zellen als Gefahrensignal erkannt werden. Es ist bekannt, dass Pathogene in der Lage dazu sind die Expression des Mannose-Rezeptors aufzuregulieren. In diesem Kapitel soll untersucht werden ob die Nanopartikel ebenfalls in der Lage dazu sind die Expression verschiedener Rezeptoren aufzuregulieren. Dazu wurde zunächst die Expression des DEC205-Rezeptors (viel auf DCs) und des Mannose-Rezeptors (CD206, wenig auf DCs) betrachtet. Es erfolgte eine Inkubation der DCs mit den

Nanopartikeln. Anschließend wurden die Zellen nach verschiedenen Zeiten auf die Expression der einzelnen Rezeptoren untersucht.

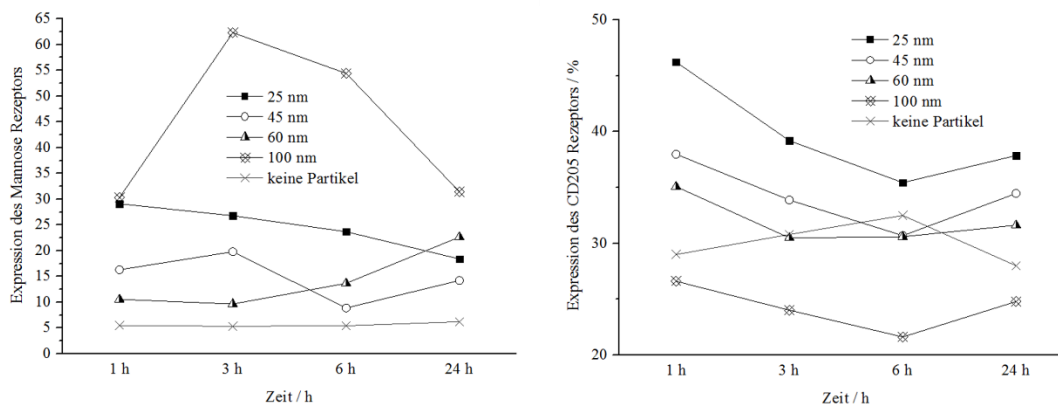


Abbildung 106: Rezeptorexpression (DEC205 und Mannose) von DCs nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.

Beide Rezeptoren werden zunächst durch die Anwesenheit der Partikel stark aufreguliert (Abbildung 106, Sprung von „0 h“ auf 1 h). Alle DCs, die Nanopartikel aufgenommen haben, zeigen generell über den gesamten Zeitverlauf eine höhere Expression des Mannose-Rezeptors, im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zellen, die 45 nm Partikel gebunden haben, zeigen über den Zeitverlauf eine untereinander vergleichbare, weitgehend konstant erhöhte Mannose-Rezeptor-Oberflächenexpression. Zellen, die 25 nm Partikel aufgenommen haben, weisen nach einer Stunde Koinkubation eine höhere Expression auf, als die mit den größeren Partikeln (45, 60 nm). Allerdings nimmt die Expressionsstärke über den Zeitverlauf hin kontinuierlich auf das Niveau der beiden anderen Partikeltypen ab. DCs, die mit 100 nm Partikeln inkubiert wurden, zeigen nach einer Stunde die höchste Aufregulation der Mannose-Rezeptor-Oberflächenexpression. Diese nimmt stetig bis zu sechs Stunden Inkubationsdauer zu, fällt jedoch danach auf das Expressionsniveau der anderen Gruppen ab.

Da der Mannose-Rezeptor bei unbehandelten dendritischen Zellen kaum exprimiert wird, ist der Einfluss der Nanopartikel auf dessen Expression sehr interessant. Um zu klären, ob es sich hier um einen spezifischen Effekt handelt oder ob die Nanopartikel auch auf andere C-Typ

Lektin-Rezeptoren regulierende Effekte ausüben, wurde zusätzlich die Expression des CD205-, CD209- und Dectin-1-Rezeptors untersucht.

Die Expression des DEC205-Rezeptors folgt dem gleichen Trend wie die des Mannose-Rezeptors (siehe Abbildung 106), wobei die 100 nm Partikel hier sogar eine Runterregulation verursachen.

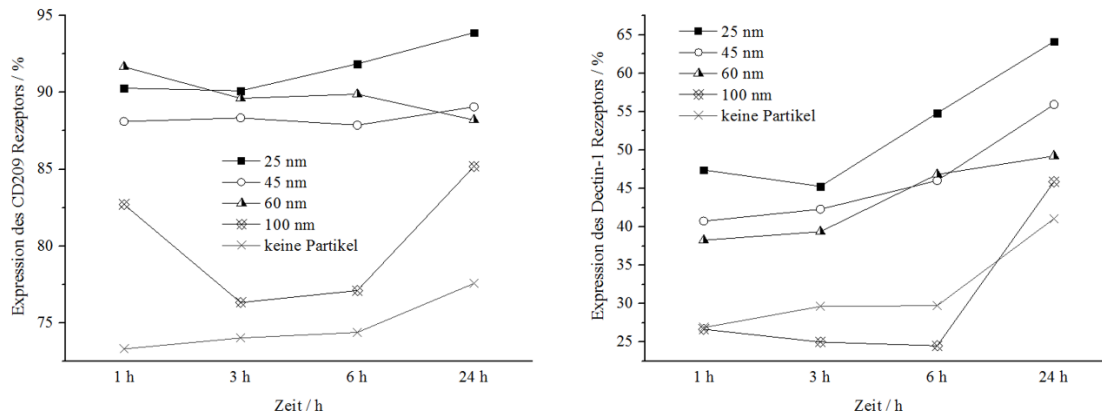


Abbildung 107: Rezeptorexpression (CD209 und Dectin-1) von DCs nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.

Bei dem CD209- und Dectin-1-Rezeptor folgt die Aufregulation demselben Trend (Abbildung 107), wie auch beim DEC205-Rezeptor. Die kleinsten Nanopartikel sind verantwortlich für die höchste Expression. Das größte Partikel führt zwar auch zu einer vermehrten Expression (anders als beim DEC205), liegt aber immer noch unter den anderen Partikeln. Der Effekt der 100 nm großen Partikel ist also spezifisch für den Mannose Rezeptor.

Durch die Blockierung eines Rezeptors, der vermeintlich für die Partikelaufnahme zuständig ist, sollte diese deutlich herabgesetzt werden können. Dazu wurde ein Teil der DCs zuerst mit Serum präinkubiert. Dadurch sollten die Rezeptoren, an die die Serumproteine binden, blockiert werden und somit nicht mehr für die Aufnahme der Nanopartikel zur Verfügung stehen. In Abbildung 108 ist zu sehen, dass die Partikelaufnahme von mit Serum präinkubierten Zellen deutlich herabgesetzt werden konnte.

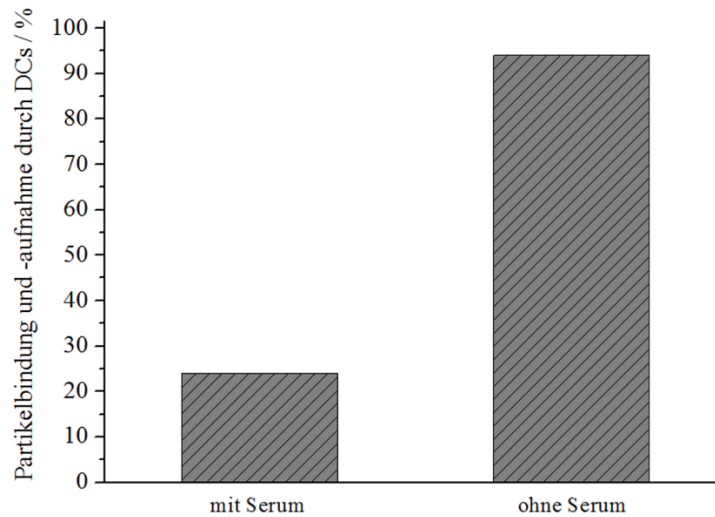


Abbildung 108: Partikelaufnahme der Zellen mit und ohne Serumpräinkubation für die Untersuchung der Rezeptorblockade.

### 6.2.3 Makrophagen vs. dendritische Zellen

Die Arbeiten in diesem Kapitel wurden von [REDACTED], AG [REDACTED], Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Es wird im Folgenden meist von der Partikelaufnahme in die Zellen gesprochen, wobei die Aufnahme oder die Bindung an die Zellen gemeint ist. Mit den angewandten FACS-Analysen kann nicht zwischen Aufnahme und Bindung unterschieden werden. Hier sollte gezeigt werden, welche Rollen der Scavenger-, der Fc $\gamma$ -Rezeptor (CD16, CD32) und der MAC-1-Rezeptor bei der Aufnahme von Silicapartikeln in dendritische Zellen und Makrophagen besitzen. Hierzu wurden 25 nm und 60 nm große fluoreszenzmarkierte SiO<sub>2</sub>-Partikel mit BMDCs und Makrophagen (ebenfalls *bone marrow derived*) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die FACS-Analyse der Zellen erfolgte jeweils nach sechs und 24 Stunden. Es wurden die Bindungseffizienzen von unbehandelten und mit Serum präinkubierten Silicapartikeln untersucht (Präinkubation: 1 h, 37°C, 50% nativem Mausserum).

Zusätzlich wurden die nicht funktionalisierten Partikel (nur FITC markiert) mit IgG1 funktionalisierten Partikeln verglichen, was einen Einfluss auf die Bindung/Aufnahme über den Fc $\gamma$ -Rezeptor haben sollte.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass der Scavenger-Rezeptor eine Rolle bei der Aufnahme von Nanopartikeln spielt.<sup>[111]</sup> Um einen möglichen Beitrag dieses Rezeptors für die Bindung der Silicapartikel zu untersuchen, wurden die Zellen mit Serum präinkubiert, da Scavenger-Rezeptoren natürlicherweise Serumkomponenten binden. Sollten diese Rezeptoren also für die Aufnahme der Partikel verantwortlich sein, würde der Überschuss an Serum die Rezeptor-Partikel-Interaktion kompetitiv inhibieren.

Des Weiteren wurde der Einfluss des MAC-1-Rezeptors der Zellen auf eine Bindung von Silicananopartikeln hin untersucht. Hierzu wurden CD11b und CD18 *Knockout*-Zellen (Zellen, bei denen bestimmte Gene ausgeschaltet wurden und somit nicht mehr zur Verfügung stehen) verwendet. CD11b und CD18 heterodimerisieren zu MAC-1. Ist eins der beiden Proteine nicht mehr vorhanden (*knockout*), kann der MAC-1-Rezeptor nicht gebildet werden. So kann die Aufnahme der Partikel von den Zellen mit und ohne MAC-1 untersucht werden.

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse aller Versuche kurz zusammengefasst werden. Alle zugehörigen Daten befinden sich im Anhang (E.5 – Weitere Ergebnisse – Einfluss verschiedener Rezeptoren auf die Aufnahme von Silicananopartikeln in DCs und Makrophagen).

### **Dendritische Zellen**

Die *Knockout*- und die Wildtyp-Zellen (natürlicher Genomzustand) haben eine vergleichbare Menge an Nanopartikeln (25 nm + 60 nm) gebunden/aufgenommen. Nach 24 h war die Aufnahme gegenüber der 6 h Inkubation leicht erhöht. Die Blockierung des Scavenger- und des Fc $\gamma$ -Rezeptors hatte bei beiden Zelltypen keinen deutlichen Effekt (25 nm). Allerdings kann gesagt werden, dass die IgG1 funktionalisierten Partikel verstärkt über den Fc $\gamma$ -Rezeptor aufgenommen wurden, da durch dessen Blockierung die Aufnahme der Partikel reduziert wurde. Bei den *Knockout*-Zellen konnte eine erhöhte Aufnahme der Partikel beider Größen festgestellt werden, wenn diese mit Serum präinkubiert wurden.

## **Makrophagen**

Bei den Wildtyp-Zellen fand nach 24 h gegenüber 6 h Inkubation eine erhöhte Aufnahme der 60 nm Partikel statt. Wurden die Partikel mit Serum präinkubiert, war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die Blockierung des Fc $\gamma$ -Rezeptors übt bei beiden Zelltypen keinen Effekt auf die Partikel Aufnahme aus. Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ist die Aufnahme der Partikel in die *Knockout*-Zellen nach 6 h höher. Die *Knockout*-Zellen zeigen ähnlich wie die Wildtyp-Zellen eine erhöhte Aufnahme der 60 nm Partikel nach 24 h. Im Vergleich zu den dendritischen Zellen exprimieren die meisten Makrophagen CD86, unabhängig von der Partikelgröße. Lediglich bei den Zellen, deren Scavenger-Rezeptor blockiert war, war die Expression etwas geringer.

## **6.3 Zusammenfassung**

Es konnte gezeigt werden, dass nicht funktionalisierte Silicananopartikel von dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen aufgenommen/gebunden werden können. Hierbei haben vor allem die Größe der Partikel und die Anwesenheit von Serum Einfluss auf die Aufnahme in die jeweiligen Zellen. Bei den dendritischen Zellen und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der Fc-Rezeptor für die Aufnahme der Partikel in die Zelle eine Rolle spielt. Hierzu müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, in denen die Rezeptoren unter anderem spezifisch blockiert werden, um deren tatsächlichen Einfluss zu bestätigen. Weitere Wiederholungsexperimente mit verschiedenen Partikelchargen sollten die genauen Einflüsse, gerade auch bei den Makrophagen, besser erklären können.

Mit Hilfe von 3D-Fluoreszenzaufnahmen, wie sie bei den Mastzell-Experimenten aufgenommen wurden könnten genauere Aussagen über die Aufnahme/Bindung der Partikel in die Zellen getroffen werden.

Wurden die Nanopartikel mit Serum präinkubiert, kam es (gerade bei den größten Partikeln) oftmals zu deren Agglomeration. Diese Agglomerate führen sehr wahrscheinlich zu ganz anderen Effekten auf die Zelle als dies einzelne Partikel bewirken würden, weshalb sie in Zukunft unterbunden werden sollten. Dies kann eventuell mit weiteren Oberflächenliganden zur Stabilisierung der Partikel erreicht werden.

Die Rolle des Mannose-Rezeptors für die Aufnahme der SiO<sub>2</sub>-Partikel in die DCs ist von großem Interesse. Hierzu müssen weitere Studien durchgeführt werden, die Aufklärung darüber geben sollen, wie die Aufregulation des Rezeptors genau funktioniert.

Des Weiteren soll der Verbleib der Partikel in den Zellen weiter verfolgt werden, sowie der Einfluss dieser auf die Antigenpräsentation der Zellen.

In weiteren Schritten können die Nanopartikel dann mit spezifischen Zielstrukturen für die jeweiligen Zellen ausgestattet werden. Diese Funktionalisierungen sollen zunächst zu einer erhöhten bzw. gezielteren Aufnahme der Partikel in die Zellen (Antikörperkopplung) und anschließend zu einer „Spezialisierung“ der Zellen führen (Antigen-/Stimuluskopplung).





# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese und Charakterisierung von verschiedenen Nanopartikeln gezeigt, die hauptsächlich in der Biomedizin zur Anwendung kamen. Zum einen wurden unterschiedlichste Arten von Silicapartikeln hergestellt, deren Form und Größe sich über verschiedene Reaktionsparameter steuern ließ, zum anderen wurden Metall- und Metalloxidnanopartikel wie Pt@MnO erfolgreich hergestellt, die später auf unterschiedliche Weise mit SiO<sub>2</sub> kombiniert wurden. Über die Kombination beider Materialien wurden alle Partikel für eine potentielle biomedizinische Anwendung in die wässrige Phase überführt. Die gebildete Silicahülle oder -domäne schützt die metallhaltigen Partikel jedoch auch vor einer schnellen Zersetzung in Lösung und setzte die etwaige Toxizität dieser Partikel herab.

Mit den Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimerpartikeln wurde eine neuartige Partikelstruktur vorgestellt, die aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit, geringen Toxizität und röntgenstrahlabschwächenden Eigenschaften ein hohes Potential für die biomedizinische Anwendung aufweist. Eine weitere potentielle Anwendung dieser Partikel liegt im Bereich der Katalyse, da es sich gezeigt hat, dass sie eine sehr große katalytisch aktive Oberfläche besitzen.

Die manganbasierten Partikel eignen sich aufgrund ihrer redoxaktiven Oberfläche für den Einsatz als Biomimetika. Erste Ergebnisse für die MnO- und Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Partikel konnten dies zeigen, allerdings muss hier in Zukunft noch eine genaue Überprüfung der katalytischen

Eigenschaften durchgeführt werden, um einen Einsatz als Biomimetika zu realisieren. An die Pt@MnO-Partikel konnte bereits erfolgreich ein Protein angebunden werden, welches ebenfalls dem Einsatz in der Biomimetik dienen soll.

Der Hauptbestandteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese und Biofunktionalisierung von Silicananopartikeln für die Anwendung in der Krebsimmuntherapie.

Hier wurde gezeigt, dass die Silicapartikel mit einem Zytokin wie TNF $\alpha$  ausgestattet werden können, ohne dessen Bioaktivität zu beeinträchtigen. Im Mausmodell erzielten diese Partikel dieselben Ergebnisse wie reines TNF $\alpha$ . Des Weiteren war es möglich, Interleukin-2 und siRNA an die Partikel zu binden, was zu einer Unterdrückung der T<sub>Reg</sub>-Proliferation und somit zu einer Unterstützung der T-Zellen aus der Immunabwehr bei der Bekämpfung von malignem Gewebe führen soll.

Im nächsten Schritt soll für die SiO<sub>2</sub>-TNF $\alpha$ -Partikel weiterhin gezeigt werden, dass sie durch eine Anreicherung im Tumor eine gegenüber reinem TNF $\alpha$  geringere systemische toxische Wirkung besitzen. Für die IL-2- und die siRNA-Partikel muss überprüft werden, ob sie tatsächlich die Proliferation von T<sub>Reg</sub>-Zellen unterbinden können. Zuletzt soll eine Kombination aller Wirkstoffe auf einem Partikel stattfinden, was zum einen eine Unterstützung des Immunsystems bewirken und zum anderen das Tumorgewebe direkt bekämpfen soll.

Diese Silicapartikel konnten ebenso erfolgreich in der Tumorrandkontrastierung eingesetzt werden, indem sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) und einer spezifischen Zielstruktur für Tumorgewebe (anti-EGFR-Antikörper) ausgestattet wurden. Nach der Inkubation des Tumorgewebe mit den modifizierten Partikeln fand eine Bindung derselben an das maligne Gewebe über dessen EGF-Rezeptoren statt. Das so markierte Gewebe konnte anschließend mit Hilfe der konfokalen Laserendoskopie sichtbar gemacht werden.

Hier wäre es wünschenswert, eine flächendeckendere Kontrastierung des malignen Gewebes zu erreichen, um eine spätere R0-Resektion zu ermöglichen. Weiterhin sollen weitere Kopf-Hals-Tumorzellen untersucht werden, um das Anwendungsgebiet zu vergrößern.

---

Neben den T-Zellen gibt es noch viele weitere Zellen des Immunsystems, die für die Abwehr und Bekämpfung von Krankheiten zuständig sind. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss die Silicananopartikel auf dendritische Zellen, Makrophagen und Mastzellen besitzen, um diese später als Transporter zu diesen Zellen einsetzen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine größenabhängige Aufnahme der Partikel in die Zellen erfolgt, welche bei einer Präinkubation der Partikel mit Mausserum abweicht. Weiterhin ist die Aufnahme der Partikel rezeptorabhängig.

Hier ist es von großem Interesse zu verstehen, wie genau der Aufnahmemechanismus der Partikel in die Zellen funktioniert, da so eine gezielte Ansteuerung der Partikel über die beteiligten Rezeptoren erfolgen kann. Die Frage ist auch, ob die Partikel die Aufnahme von Stimuli oder Antigenen in die Zellen beeinflusst. Abschließend sollen die Partikel selbst mit rezeptorspezifischen Antikörpern, Antigenen und anderen Wirkstoffen ausgestattet werden, um eine spezifische Ansteuerung, Aufnahme und Reifung von Zellen zu ermöglichen.

Auf dem Gebiet der Krebsimmuntherapie mit Hilfe von Nanopartikeln wurde bereits sehr viel erreicht, jedoch wurden auch sehr viele Fragen aufgeworfen und vieles ist noch unverständlich.<sup>[1]-[3], [6]-[8]</sup>

Mit den hier vorgestellten Silicananopartikel konnte jedoch aufgrund ihrer geringen Toxizität und guten Modifizierbarkeit gezeigt werden, dass ihr Potential für die Anwendung in verschiedenen Bereichen der Krebsimmuntherapie sehr hoch ist.



# Kapitel 8

## Experimenteller Teil und Methoden

### 8.1 Experimenteller Teil

Die Synthesen der Metall- und Metalloxidnanopartikel wurden mit Hilfe einer Schlenklinie unter Schutzgas durchgeführt. Hierzu wurde zu Beginn jeder Synthese, die mit den Edukten bestückte Reaktionsapparatur, auf 80°C erwärmt und dreimal bis zu  $3 \cdot 10^{-2}$  mbar evakuiert und mit Argon geflutet.

#### **Standardaufreinigungsverfahren 1: Hydrophobe Partikel**

Nach der Synthese wurden die hergestellten Nanopartikel in ein Zentrifugenrohr (50 mL) überführt und mit einem polaren Lösungsmittel, meist Aceton, ausgefällt und abzentrifugiert (9000 rpm, 10 min). Das Nanopartikel „Pellet“ konnte nun in einem unpolaren Lösungsmittel, wie Hexan redispergiert und zum Waschen erneut gefällt und abzentrifugiert werden. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt und die aufgearbeiteten Nanopartikel bei 4°C in Hexan gelagert.

### **Standardaufreinigungsverfahren 2: Hydrophile Partikel**

Nach der Synthese wurden die hergestellten Nanopartikel in ein Zentrifugenrohr (50 mL) überführt und abzentrifugiert (9000 rpm, 10 min). Anschließend wurden sie in Ethanol redispersiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt und die aufgearbeiteten Nanopartikel bei 4°C in Ethanol gelagert.

### **Standardaufreinigungsverfahren 3: Hydrophile Partikel**

Nach der Synthese wurden die hergestellten Nanopartikel in ein Zentrifugenrohr (50 mL) überführt und mit einem unpolaren Lösungsmittel, meist Hexan, ausgefällt und abzentrifugiert (9000 rpm, 10 min). Das Nanopartikel „Pellet“ konnte nun in einem polaren Lösungsmittel, wie Ethanol redispersiert und zum Waschen erneut gefällt und abzentrifugiert werden. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt und die aufgearbeiteten Nanopartikel bei 4°C in Ethanol gelagert.

#### **8.1.1 Pt-Partikel**

Für die Synthese von Pt-Nanopartikeln wurden 100 mg Platin(II)acetylacetonat (abcr, AB121416), je 1 mL Ölsäure (Fisher, 204-207-1) und Oleylamin (Acros, 129541000) und 10 mL 1-Octadecen (techn. 90%, Sigma Aldrich, O806) vorgelegt und nach dem Sekurieren auf 120°C geheizt. Nach der Zugabe von 50 µL einer zehnprozentigen Eisenpentacarbonyllösung (Sigma, 195731) wird auf 200°C geheizt und diese Temperatur für 1 h gehalten. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und abgekühlt. Danach erfolgte die Aufreinigung nach dem wie oben beschriebenen Standardverfahren 1.

#### **8.1.2 FePt**

Die Synthese der FePt-Nanopartikel verläuft ähnlich der Platinpartikelsynthese. Es wurden 100 mg Platin(II)acetylacetonat und 15 mL 1-Octadecen vorgelegt und nach dem Sekurieren

---

auf 130°C geheizt. Nachdem Erreichen dieser Temperatur, wurden zunächst gleichzeitig 0,8 mL Ölsäure und 0,1 mL Eisenpentacarbonyl zugegeben und nach weiteren 5 min 1,2 mL Oleylamin. Anschließend wurde auf 180°C geheizt und die Temperatur für 1 h gehalten. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und abgekühlt. Danach erfolgte die Aufreinigung nach dem wie oben beschriebenen Standardverfahren 1.

### 8.1.3 Mangan(II)-Oleat

Zur Darstellung des Mangan(II)-Oleats wurden eine Kalilauge-Methanol-Lösung, aus 4,4 g KOH und 200 mL Methanol und eine Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat/Ölsäure-Methanol-Lösung, aus 22 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 8 g Ölsäure und 200 mL Methanol hergestellt. Die Kalilauge-Lösung wurde langsam zur Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat/Ölsäure-Lösung getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde noch eine Stunde gerührt, die überstehende Lösung abdekantiert und das ausgefallene rot-braune, wachsartige Produkt mit Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Oleat in Hexan gelöst, mit Methanol und Wasser ausgeschüttelt und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Hexan wurde zunächst im Grobvakuum, mit Hilfe eines Rotationsverdampfers und anschließend im Feinvakuum, mit Hilfe der Schlenklinie entfernt.

### 8.1.4 $\text{MnO}$ <sup>[28]</sup>

Zur Herstellung von  $\text{MnO}$ -Nanopartikeln wurden 1,3 g Mangan(II)-Oleat und 10 mL 1-Octadecen vorgelegt und sekuriert. Dann wurde das Reaktionsgemisch, mit Hilfe eines Heizreglers in 2°C/min Schritten auf 320°C geheizt und die Temperatur für 30 min gehalten. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Heizquelle entfernt. Danach erfolgte die Aufreinigung nach dem wie oben beschriebenen Standardverfahren 1.

### 8.1.5 MnO<sub>2</sub>

#### **Variante A:** <sup>[112]</sup>

Für die Synthese von MnO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurden 20 mg Kaliumpermanganat (Sigma Aldrich) in 15 mL Wasser, bei Raumtemperatur gelöst. Danach wurden 2 g Triton™ X-100 (Tensid, Sigma Aldrich) zu der KMnO<sub>4</sub>-Lösung hinzugegeben und 1 h gerührt. Die Partikel wurden mit Ethanol gewaschen.

#### **Variante B:** <sup>[113]</sup> siehe Kapitel 2.2.3, Abbildung 4

Es wurden 53 mg Kaliumpermanganat in 5 mL Wasser gelöst (RT) und 124 mg Polyallylaminhydrochlorid (Sigma Aldrich) in weiteren 10 mL Wasser. Danach wurden 5 mL Wasser in einem Kolben vorgelegt und beide Lösungen bei Raumtemperatur unter Rühren zugetropft. Die Partikel wurden mit Ethanol gewaschen.

### 8.1.6 Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Zur Darstellung von Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln wurden 100 mg der zuvor hergestellten MnO-Partikel, zusammen mit 100 mg Trimethylaminoxid (Sigma Aldrich, 317594) in 10 mL 1-Octadecen für vier Stunden auf 300°C erhitzt. Danach erfolgte die Aufreinigung nach dem wie oben beschriebenen Standardverfahren 1.

### 8.1.7 Pt/FePt@MnO

Für die Synthese von Pt@MnO-Nanopartikeln (FePt@MnO) wurden 10 mg Platin-/FePt-Partikel, 0,3 mL Ölsäure, 0,65 mL Oleylamin, 10 – 50 mg Mangan(II)-Oleat (je nach gewünschter MnO-Domänengröße) und 10 mL Hexadecan (Sigma Aldrich) vorgelegt. Danach wurde auf 290°C geheizt und die Temperatur eine Stunde gehalten. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und abgekühlt. Danach erfolgte die Aufreinigung nach dem wie oben beschriebenen Standardverfahren 1.



Tabelle 3: Ansatzgrößen zur Darstellung der unterschiedlich großen MnO-Domänen.

Mangan(II)-Oleat	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg
MnO-Domänengröße	4 nm	8 nm	12 nm	16 nm	20 nm

### 8.1.8 SiO<sub>2</sub> über den klassischen Weg nach Stöber

Zur Darstellung von Siliziumdioxidnanopartikeln wurden 35 mL Ethanol, 5 mL Wasser und  $n$  mL Ammoniumhydroxid vorgelegt,  $n = 0,8 - 1,5$  mL und erwärmt (Temperaturbereich: 30°C – 80°C). Je nach gewünschter Größe variiert die Ammoniakmenge und die Reaktionstemperatur. Nachdem die Reaktionstemperatur erreicht wurde, erfolgt die schlagartige Zugabe von TEOS. Das Reaktionsgemisch wurde dann noch 1 h bei der jeweiligen Reaktionstemperatur gehalten, bevor die Reaktion abgebrochen und die Partikel aufgereinigt wurden. Der Reaktionsabbruch wurde durch Zentrifugation der Partikel bei 9000 rpm für 10 min erreicht. Die Aufreinigung erfolgte durch das Standardaufreinigungsverfahren 2. Tabelle 4 zeigt die benötigten Reaktionsparameter zur Einstellung der gewünschten Größe der SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel.

Tabelle 4: Parametertabelle zur Darstellung unterschiedlich großer Silicananopartikel.

Nanopartikel- durchmesser in nm	NH <sub>4</sub> OH in mL	Reaktions- temperatur in °C
20 - 25	1	75
40 - 50	1,5	75
40 - 50	1	70
60 - 75	1,5	70
50 - 60	1	65
75 - 100	1,5	65
75 - 100	1,5	60

### 8.1.9 SiO<sub>2</sub> über die reverse Mikroemulsion

Für die Synthese von SiO<sub>2</sub>-Partikeln über die reverse Mikroemulsion wurde zunächst das Tensid, Igepal® CO-520 (Sigma Aldrich, 238643) in 35 mL Cyclohexan gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde langsam der Ammoniak (Sigma Aldrich) zugetropft und für weitere 10 min gerührt. Dann erfolgte die Zugabe des Tetraethylorthosilikates (Aldrich, 865716) und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Sollten die Partikel zusätzlich mit einem PEG funktionalisiert werden, wurden am nächsten Tag zunächst 150 µL 2-Methoxy(Polyethyleneoxy)propyl)trimethoxysilan (PEG-TES, abcr, AB212452) hinzugegeben und weitere 2 h gerührt. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (9000 rpm, 10 min), in Ethanol redispersiert und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 3 gewaschen. Tabelle 5 zeigt die verschiedenen Ansatzmengen, zur Darstellung unterschiedlich großer Silicapartikel.

Tabelle 5: Verschiedene Ansatzmengen, für die unterschiedlich großen SiO<sub>2</sub>-Partikel.

Durchmesser in nm	Igepal in g	NH <sub>4</sub> OH in mL	TEOS in mL
25	2	0,5	0,2
32	2	0,5	0,5
45	8	0,8	0,8
60	8	0,4	0,4

### 8.1.10 mSiO<sub>2</sub>

Zur Synthese von mSiO<sub>2</sub>-Partikeln wurden 100 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Acros, 227161000), 0,1 – 0,5 mL 2M Natronlauge in 90 mL Wasser vorgelegt und auf 70°C erhitzt (eine konstante Temperatur ist wichtig). Danach wurden 0,5 mL TEOS hinzugegeben und für 1 h auf 70°C gehalten. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2 aufgereinigt.

### 8.1.11 mSiO<sub>2</sub>@SiO<sub>2</sub> <sup>[114]</sup>

Die Herstellung der mSiO<sub>2</sub>@SiO<sub>2</sub>-Partikel verläuft analog zur Synthese der Silicapartikel nach Stöber. In der ersten Stufe werden *in situ* einfache SiO<sub>2</sub>-Partikel hergestellt, indem 35 mL Ethanol, 5 mL Wasser, 1,5 mL Ammoniak vorgelegt werden und eine Zugabe von 3 mL TEOS bei einer Temperatur von 75°C erfolgt (Bei einer Variation von pH-Wert und Temperatur können andere Größen erhalten werden, siehe Kapitel 8.1.8 SiO<sub>2</sub> über den klassischen Weg nach Stöber). Nach einer Stunde werden 1 mL Octadecyltrimethylsilan (C<sub>18</sub>TMS, Sigma Aldrich, 376213)) und weitere 2,5 mL TEOS zugegeben. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2 aufgereinigt.

### 8.1.12 mSiO<sub>2</sub>-Nanorods <sup>[115], [116]</sup>

Für die Synthese von mesoporösen Silicananorods wurden 0,123 g Pluronic<sup>®</sup> F-127 (Sigma Aldrich, P2443) und 0,3 g CTAB in 40 mL Wasser gelöst und danach mit 1 mL Ammoniak versetzt. Nach 10 min erfolgte die Zugabe von 0,2 – 3 mL TEOS und es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2.

Tabelle 6: Variation der TEOS Menge zur Steuerung der Länge von Nanorods.

Länge der Nanorods in nm	TEOS in mL
1000 – 1500	0,2
800 – 1000	0,6
400 – 700	1
200 - 400	1,4
100 – 300	1,8
150 – 200 x 150 – 200	2,4
150 – 180 x 150 – 180	3

### 8.1.13 MnO@SiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von MnO@SiO<sub>2</sub>-Kern-Schale-Partikeln wurden 2 g Igepal<sup>®</sup> CO-520 in 35 mL Cyclohexan gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mg MnO-Partikeln, gelöst in 1 mL Cyclohexan und 5 min später die Zugabe von 200 µL Ammoniak. Nach 10 min wurden 100 µL TEOS zugegeben und über Nacht gerührt. Sollten die Partikel Fluoreszenz markiert werden, wurde fünf Minuten nach der TEOS Zugabe, eine Mikrospatelspitze Fluoreszinoisothiocyanat (FITC, Sigma Aldrich, F7250) oder Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC, Sigma Aldrich, 283924) hinzugegeben. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 150 µL PEG-TES und nach 2 h wurden die Partikel abzentrifugiert (9000 rpm, 10 min), in Ethanol redispergiert und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 3 gewaschen.

### 8.1.14 MnO@mSiO<sub>2</sub>

Zur Synthese von MnO@mSiO<sub>2</sub>-Kern-Schale-Partikeln wurden 10 mg MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikel, 100 mg CTAB, 0,05 – 0,3 mL 2M Natronlauge in 90 mL Wasser vorgelegt und auf 70°C erhitzt (eine konstante Temperatur ist wichtig). Danach wurden 0,5 mL TEOS hinzugegeben und für 1 h auf 70°C gehalten. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Heizquelle abgebrochen und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2 aufgereinigt.

### 8.1.15 Hohle mSiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von hohlen mesoporösen Silicapartikeln wurden MnO@mSiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer Salzsäurelösung gewaschen. Die Salzsäure löst das MnO restlos auf. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2.

### 8.1.16 Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von Au@ZnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln wurden 2 g Igepal<sup>®</sup> CO-520 in 35 mL Cyclohexan gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann erfolgte die Zugabe von 1 mg Au@ZnO-Partikeln, gelöst in 1 mL Cyclohexan und 5 min später die Zugabe von 200 µL Wasser (in Ammoniak zersetzt sich das Zinkoxid). Nach 10 min wurden 100 µL TEOS zugegeben und über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 150 µL PEG-TES und nach 2 h wurden die Partikel abzentrifugiert und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 3 gewaschen. Eine Fluoreszenzmarkierung kann analog zu den MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln erfolgen.

### 8.1.17 Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von Pt@MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln wurden 2 g Igepal<sup>®</sup> CO-520 in 35 mL Cyclohexan gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann erfolgte die Zugabe von 10 mg Pt@MnO-Partikeln, gelöst in 1 mL Cyclohexan und 5 min später die Zugabe von 200 µL Ammoniak. Nach 10 min wurden 100 µL TEOS zugegeben und über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 150 µL PEG-TES und nach 2 h wurden die Partikel abzentrifugiert und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 3 gewaschen. Eine Fluoreszenzmarkierung kann analog zu den MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln erfolgen.

### 8.1.18 Pt@SiO<sub>2</sub>

Zur Darstellung von Pt@SiO<sub>2</sub>-Partikeln wurden 2 g Igepal<sup>®</sup> CO-520 in 35 mL Cyclohexan gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann erfolgte die Zugabe von 1 mg Pt-Partikeln, gelöst in 1 mL Cyclohexan und 5 min später die Zugabe von 200 µL Ammoniak. Nach 10 min wurden 100 µL TEOS zugegeben und über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 150 µL PEG-TES und nach 2 h wurden die Partikel abzentrifugiert

und nach dem Standardaufreinigungsverfahren 3 gewaschen. Eine Fluoreszenzmarkierung kann analog zu den MnO@SiO<sub>2</sub>-Partikeln erfolgen.

### **8.1.19 Porenerweiterung von mSiO<sub>2</sub>**

Zur Porenerweiterung der mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurden 100 mg Partikel und 5 mL der Schwellsubstanz für 10 Minuten in 5 mL Ethanol und 5 mL Wasser im Ultraschallbad dispergiert. Anschließend wurde die Dispersion in einen Autoklaven überführt und für vier Tage bei 150°C im Ofen erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Standardaufreinigungsverfahren 2. Eingesetzte Schwellsubstanzen: Trimethylbenzol, Xylol, Dekalin, Cyclohexan und Toluol.

### **8.1.20 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**

Zur Funktionalisierung der Silicananopartikeloberfläche mit Aminogruppen wurden 10 mg SiO<sub>2</sub>-Partikel mit 100 – 500 µL APTS in 5 mL Ethanol 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel mit dem Standardaufreinigungsverfahren 2 gewaschen und bei 4°C in Ethanol gelagert.

### **8.1.21 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC**

Zur Markierung der SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurden 10 mg SiO<sub>2</sub>-Partikel mit 1 mg FITC/RITC in 5 mL Ethanol 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel mit dem Standardaufreinigungsverfahren 2 gewaschen und bei 4°C in Ethanol gelagert.

---

### 8.1.22 SiO<sub>2</sub>-PEI

Für die Darstellung von SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit einer Polyethyleniminhülle (PEI, Sigma Aldrich, 408727) wurden 1 mg SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel und 1 mg PEI-*branched* zusammen in 0,5 mL Ethanol in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und 12 h in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß Mixer („Eppendorf-Mixer“) geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel abzentrifugiert und in Ethanol redispergiert.

### 8.1.23 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>/siRNA und SiO<sub>2</sub>-PEI/siRNA

Bei dieser Synthese wurden entweder SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> oder SiO<sub>2</sub>-PEI-Partikel verwendet und in verschiedenen Verhältnissen mit siRNA zusammen gegeben. Hierzu wurden 10 µg der Nanopartikel mit 50 µg, 100 µg oder 200 µg anti-GFP-siRNA in 400 µL PBS-Puffer zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C geschüttelt. Danach wurden die Partikel zum Waschen abzentrifugiert (13000, 10 min), in PBS redispergiert und erneut abzentrifugiert und redispergiert. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

### 8.1.24 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-TNFα/IL-2

Die Kopplungen von TNFα und IL-2 erfolgten unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurden von allen benötigten Reagenzien sterile Stammlösungen in PBS hergestellt und unter der Sterilbank zusammen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden jeweils 2 µg Nanopartikel mit verschiedenen Mengen TNFα oder IL-2, 3 µg EDC und 2 µg NHS in 400 µL PBS gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Partikel zum Waschen abzentrifugiert (13000, 10 min), in PBS redispergiert und erneut abzentrifugiert und redispergiert. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C. Tabelle 7 zeigt die Ansatzgrößen der verschiedenen Reaktionen für die verschiedenen Nanopartikel zu TNFα/IL-2 Verhältnissen (1:1 bis 1:25).

Tabelle 7: Ansätze der unterschiedlichen Nanopartikel zu Protein Verhältnisse.

<b>SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>	<b>TNF<math>\alpha</math>/IL-2</b>
2 $\mu$ g	2 $\mu$ g
2 $\mu$ g	4 $\mu$ g
2 $\mu$ g	12,5 $\mu$ g
2 $\mu$ g	25 $\mu$ g
2 $\mu$ g	50 $\mu$ g

### 8.1.25 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Antikörper

Alle Antikörper Kopplungen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Reaktionen erfolgten entweder in Ethanol oder in sterilem PBS-Puffer unter einer Sterilbank. Dazu wurden zuvor von allen Reagenzien sterile Stammlösungen hergestellt.

#### 8.1.25.1 SiO<sub>2</sub>-EGF

Es wurden 1 mg SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC-Partikel, 25  $\mu$ g EDC, 15  $\mu$ g NHS und 15  $\mu$ g anti-EGFR-Antikörper in 500  $\mu$ L Lösungsmittel zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel 3-mal durch Abzentrifugieren (13000, 10 min) und Redispergieren aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

#### 8.1.25.2 SiO<sub>2</sub>-DEC205/Isotype Control

Es wurden 1 mg SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-FITC-Partikel, 25  $\mu$ g EDC, 15  $\mu$ g NHS und 12,5  $\mu$ g anti-DEC205-Antikörper oder Isotyp Kontrollantikörper (unspezifische Kontrolle) in 500  $\mu$ L Lösungsmittel zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht.



Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel 3-mal durch Abzentrifugieren (13000, 10 min) und Redispergieren aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

## **8.1.26 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-CpG/Ovalbumin**

### **8.1.26.1 SiO<sub>2</sub>-CpG**

Es wurden 0,5 mg SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Partikel, 12 µg EDC, 7 µg NHS und 50 µg CpG in 500 µL Lösungsmittel zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel 3-mal durch Abzentrifugieren (13000, 10 min) und Redispergieren aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

### **8.1.26.2 SiO<sub>2</sub>-Ovalbumin**

Es wurden 0,5 mg SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Partikel, 12 µg EDC, 7 µg NHS und 25 µg Ovalbumin (Gray Peptide/SIINFEKL oder jeweils 12,5 µg von beiden) in 500 µL Lösungsmittel zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel 3-mal durch Abzentrifugieren (13000, 10 min) und Redispergieren aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

### **8.1.26.3 SiO<sub>2</sub>-Ovalbumin/CpG**

Es wurden 0,5 mg SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Partikel, 12 µg EDC, 7 µg NHS und 10 µg Gray Peptide, 10 µg SIINFEKL und 8 µg CpG in 500 µL Lösungsmittel zusammen gegeben und 12 h auf einem Eppendorf-Mixer, bei 15°C zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel 3-mal durch Abzentrifugieren (13000, 10 min) und Redispergieren aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in PBS, bei 4°C.

## **8.2 Methoden**

### **8.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie**

Für die TEM Aufnahmen wurden die Proben verdünnt, auf einem TEM-Grid (mit Graphitbeschichtung) aufgebracht und mit einem Philips Transmissionselektronenmikroskop EM-420 abgebildet. Die Beschleunigungsspannung dieses Geräts beträgt 120 kV und das Auflösungsvermögen liegt bei 3,3 nm. Eine LaB<sub>6</sub> Kathode dient als Elektronenquelle und die Bildaufnahme erfolgt mit einer Slow-scan CCD Kamera (1k·1k).

### **8.2.2 UV-Vis-Spektroskopie**

Die UV/VIS-spektroskopischen Messungen wurden mit einem Cary Varian 5G UV-VIS-NIR-Spektrometer durchgeführt. Die Proben wurden in Quarzküvetten vermessen.

### **8.2.3 Pulverröntgendiffraktometrie**

Die Aufnahmen der Pulverdiffraktogramme erfolgten mit zwei verschiedenen Diffraktometern.

#### **8.2.3.1 D8-Advance**

Hierbei handelt es sich um ein Bruker AXS D8 Advance Diffraktometer mit ungefilterter Mo K $\alpha$  Strahlung und einem energiedispersiven Festkörperdetektor SoIX. Die Probenfixierung erfolgte zwischen zwei Filmen Scotch Magic Klebeband. Die Phasenanalyse erfolgte anhand der PDF-2 Datenbank<sup>[117]</sup> mit Bruker AXS EVA.

---

### 8.2.3.2 D5000

Hierbei handelt es sich um ein Siemens D5000 Pulverdiffraktometer mit monochromatisierter Cu K $\alpha$  Strahlung und einem Braun M50 sensitiven Detektor. Die Probenfixierung erfolgte zwischen 2 Klebefilmen von Scotch Magic. Die Phasenanalyse<sup>[118]</sup> erfolgte mit Bruker EVA.

### 8.2.4 Zetasizer

Die Oberflächenpotentialbestimmungen und die Lichtstreuungsexperimente erfolgten an einem Malvern Zetasizer Nano ZS. Dazu wurden die Partikel in 1 mL Ethanol oder Wasser gelöst, filtriert (Millex-GS Spritzenfilter, Merck Millipore, Porengröße = 0,22  $\mu$ m) und in die Malvern-Küvetten (Disposable capillary cell DTS1061) überführt.

Lichtstreuung: Messwinkel = 173°, T = 25°C, 25 Einzelmessungen zur Bestimmung der mittleren Größenverteilung.

Oberflächenpotentialmessung: T = 25°C, 2x15 Einzelmessungen zur Bestimmung des mittleren Zetapotentials (ZP).

### 8.2.5 IR-Spektroskopie

Die IR-spektroskopischen Messungen erfolgten auf einem Bruker Tensor 27 Spektrometer. Die Proben wurden in Form eines KBr Presslings vermessen.

### 8.2.6 ELISA

Für die ELISA Analysen wurde zunächst eine 96-well-Platte mit dem für TNF $\alpha$ /IL-2 spezifischen „Coating-Antikörper“ beschichtet und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen und fixieren des Antikörpers erfolgte die Auftragung der Proben in verschiedenen Konzentrationen und einer Standardreihe auf die Platte. Es erfolgte wieder eine Inkubationszeit von über zwölf Stunden und ein Waschschrift, bevor der spezifische „Detektions-

Antikörper“ aufgetragen wurde. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde das Färbesubstrat und danach Schwefelsäure zum Stoppen der Färbereaktion aufgetragen. Als letztes konnten die Absorptionen der einzelnen Kammern, mit Hilfe eines 96-*well*-Platten Readers (ELISA-Reader) gemessen werden und mit der Verdünnungsreihe die Konzentrationen an TNF $\alpha$  und IL-2 bestimmt werden.

# Anhang

## A. Abkürzungsverzeichnis

<b>4-ATP</b>	4-Aminothiophenol
<b>Anti-DEC205-AK</b>	Antikörper für den DEC205-Rezeptor
<b>Anti-EGFR-AK</b>	Antikörper für den EGF-Rezeptor
<b>APS</b>	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
<b>AK</b>	Antikörper
<b>BC</b>	B-Zelle (B-Lymphozyt)
<b>BMDC</b>	Bone Marrow Derived Dendritic Cell
<b>BMMC</b>	Bone Marrow Derived Mast Cell
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroform
<b>CTAB</b>	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CTL</b>	Zytotoxische T-Lymphozyten
<b>CLR</b>	C-Typ Lectin Rezeptor
<b>CLEC</b>	C-Typ Lectin
<b>CLSM</b>	Confocal Laser Scanning Microscope
<b>C<sub>18</sub>TMS</b>	Octadecyltrimethylsilan
<b>CRD</b>	Complementarity Determining Region
<b>DC</b>	Dendritic Cell
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
<b>DD</b>	Death Domain

<b>DLS</b>	Dynamische Lichtstreuung
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>dsRNA</b>	Double-stranded RNA
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EPR</b>	Enhanced Permeability and Retention
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorting
<b>FITC</b>	Fluoreszinisothiocyanat
<b>FOXP3</b>	Forkhead-Box-Protein P3
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>HSAB</b>	Hard and Soft Acids and Bases
<b>HNSCC</b>	Head and Neck Squamous Cell
<b>HU</b>	Huntsfield Unit
<b>IgG</b>	Immunglobulin-G
<b>IL-2</b>	Interleukin-2
<b>MHCI</b>	Major Histocompatibility Complex I
<b>MHCII</b>	Major Histocompatibility Complex II
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>NP</b>	Nanopartikel
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>OVA-DQ<sup>TM</sup></b>	Ovalbumin-Farbstoff Konjugat (BODIPY)
<b>PBS</b>	Phosphate buffered Saline
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PEG-TES</b>	2-[Methoxy(polyethylglycol)propyl]trimethoxysilan
<b>PET</b>	Positronenemissionstomographie
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>RES</b>	Retikuloendotheliales System
<b>RITC</b>	Rhodamin B Isothiocyanat
<b>rME</b>	Reverse Mikroemulsion
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid

<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SOD</b>	Superoxid-Dismutase
<b>ssRNA</b>	Single-stranded RNA
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SIINFEKL</b>	Ovalbuminsequenz
<b>TAA</b>	Tumorassoziertes Antigen
<b>TC</b>	T-Zelle (T-Lymphozyt)
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskopie
<b>TEOS</b>	Tetraethylorthosilicat
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TLR</b>	Toll Like Rezeptor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>T<sub>Reg</sub></b>	Regulatorische T-Zellen

## B. Literaturverzeichnis

- [1] L. Brannon-Peppas und J. Blanchette, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 206-212.
- [2] A. Ito, H. Honda und T. Kobayashi, *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55, 320-328.
- [3] J. Timmerman und R. Levy, *Annual Review of Medicine*, 1999, 50, 507-529.
- [4] L. Reddy, J. Arias, J. Nicolas und P. Couvreur, *Chemical Reviews*, 2012, 112, 5818-5878.
- [5] W. Wu, Q. He und C. Jiang, *Nanoscale Research Letters*, 2008, 3, 397-415.
- [6] J. Vivero-Escoto, I. Slowing, B. Trewyn und V. Lin, *Small*, 2010, 6, 1952-1967.
- [7] M. Manzano, M. Colilla und M. Vallet-Regi, *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6, 1383-1400.
- [8] E. Gyenge, X. Darphin, M. Bredell und C. Maake, *Journal of Nanobiotech.*, 2011, 9, 32.
- [9] G. Lucignani, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36, 869-874.
- [10] K. Kelly, E. Coronado, L. Zhao und G. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 668-677.
- [11] Y. Xia, H. Yang und C. Campbell, *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46, 1671-1672.
- [12] D. Kim, S. Park, J. Lee, Y. Jeong und S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 7661-7665.
- [13] C. Xu, G. Tung und S. Sun, *Chem. Mater.*, 2008, 20, 4169.
- [14] D. Vollath, in *Nanoparticles - Nanocomposites - Nanomaterials*, Wiley, 2013, pp. 4-5.
- [15] Z. Gu, H. Uetsuka, A. Fujishima und O. Sato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 894-897.
- [16] M. Warsi, R. Adams und V. Chechik, *Chemical Communications*, 2010, 46, 451-453.
- [17] T. Schladt, K. Schneider, H. Schild und W. Tremel, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 6315-6343.
- [18] H. Bin Na, C. Song und T. Hyeon, *Advanced Materials*, 2009, 21, 2133-2148.
- [19] „www.miltenyibiotec.com,“ miltenyibiotec. [Online]. [Zugriff am 17 06 2014].
- [20] V. LaMer und R. Dinegar, *JACS*, 1950, 72, 4847-4854.
- [21] W. Ostwald, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1900, 34, 495-503.



- 
- [22] W. Stöber und M. Arnold, *Kolloid Zeitschrift*, 1961, 174, 1, 20-27.
- [23] Y. Liu, D. Li und S. Sun, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 12579-12587.
- [24] C. Murray, D. Norris und M. Bawendi, *JACS*, 1993, 115, 8706-8715.
- [25] C. Wang, H. Daimon, Y. Lee, J. Kim und S. Sun, *JACS*, 2007, 129, 6974-6975.
- [26] J. Wu, A. Gross und H. Yang, *Nanoletters*, 2011, 11, 798-802.
- [27] C. Wang, Y. Hou, J. Kim und S. Sun, *Angew. Chem.*, 2007, 46, 6333-6335.
- [28] T. Schladt, T. Graf und W. Tremel, *Chemistry of Materials*, 2009, 21, 3183-3190.
- [29] J. Kelly, G. Keegan und M. Brennan-Fournet, *Acta Physica Polonica*, 2012, 122, 337-345.
- [30] D. Gömpel, M. Tahir, M. Panthöfer, E. Mugnaioli, R. Brandscheid, U. Kolb und W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry*, 2014, 2, 8033-8040.
- [31] A. Rabenau und et al., *Angewandte Chemie*, 1985, 97, 1017-1032.
- [32] W. Sheldrick und e. al., *Angewandte Chemie*, 1996, 109, 214-234.
- [33] G. Scherer und et al., *Journal of the American Ceramic Society*, 1990, 73, 3-14.
- [34] F. Kirkbir, H. Murata und D. Meyers, *J. of Sol-Gel Science and Technology*, 1996, 6, 203-217.
- [35] Y. Luo, *Materials Letters*, 2007, 61, 1893-1895.
- [36] S. Sakka, *Journal of Sol-Gel Science and Technology.*, 2008, 46, 241-249.
- [37] H. Yang, N. Coombs und G. Ozin, *Adv. Mater.*, 1997, 9, 811-814.
- [38] C. Kresge, M. Leonowicz, W. Roth, C. Vartuli und J. Beck, *Nature*, 1992, 359, 710-712.
- [39] C. Schmitt, K. Chu, C. Olson und D. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 10834-43.
- [40] C. Janeway, P. Travers, M. Walport und M. Shlomchik, *Immunologie*, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002, 5. Auflage.
- [41] M. Chao und et al., *Science Translational Medicine*, 2, 63, 63ra94.
- [42] H. Herzog, *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, 76, 337-342.
- [43] G. Antoch, L. Freudenberg, T. Beyer, A. Bokisch und J. Debatin, *Journal of Nuclear Medicine*, 2004, 45, 56S-64S.

- [44] H. Lee, Z. Li, A. Hsu, J. Xie, S. Sun und X. Chen, *J. of Nuclear Med.*, 2008, 49, 1371-1379.
- [45] F. Hu, K. MacRenaris und T. Meade, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 20855–20860.
- [46] T. Lammers, S. Aime, W. Hennink, G. Storm und F. Kiessling, *Accounts of chemical research*, 2011, 44, 1029-1038.
- [47] I. Lynch, A. Salvati und K. Dawson, *Nature Nanotechnology*, 2009, 4, 546-547.
- [48] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée und M. Port, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, 58, 1471-1504.
- [49] A. Smith, H. Duan, A. Mohs und S. Nie, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1226-1240.
- [50] A. Perro, S. Reculosa, S. Ravaine und E. Duguet, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 3745–3760.
- [51] T. Schladt, T. Graf, O. Köhler, H. Bauer, M. Dietzsch, J. Mertins, R. Branscheid, U. Kolb und W. Tremel, *Chem. Mater.*, 2012, 24, 525-535.
- [52] J. Hu,, S. Zhou, Y. Sun, X. Fang und L. Wu, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4356-4378.
- [53] D. Rodríguez-Fernandez und L. Liz-Marzán, *Part. Part. Syst. Charact*, 2013, 30, 46-60.
- [54] S. Lim, M. Varon, I. Ojea-Jimenez, J. Arbiol und V. Puentes, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 11518-11523.
- [55] T. Schladt, I. Shukoor, K. Schneider, N. Tahir, F. Natalio, I. Ament, J. Becker, F. Jochum, S. Weber, O. Köhler, P. Theato, L. Schreiber, C. Sönnichsen, H. Schröder, W. Müller und W. Tremel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 3976-3980.
- [56] T. Schladt, *Design of Multifunctional Magnetic Nanomaterials for Biomedical Applications*, Mainz, 2010, Dissertation, Universität Mainz.
- [57] C. Wang, H. Daimon, Y. Lee, J. Kim und S. Sun, *JACS*, 2007, 129, 6974-6975.
- [58] T. Schladt, T. Graf, O. Köhler, H. Bauer, M. Dietzsch, J. Mertins, R. Branscheid, U. Kolb und W. Tremel, *Chemistry of Materials*, 2012, 24, 525-535.
- [59] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perret und X. Yan, „*Nature Nanotechnology*,“ 2007, 2, 577.
- [60] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, S. Nath und J. Perez, „*Angew. Chem.*,“ 2008, 121, 2283.
- [61] G. Waldo und J. Penner-Hahn, „*Biochemistry*,“ 1995, 34, 1507.
- [62] Y. Li und et al., „*Nat. Genet.*,“ 1995, 11, 376.
- [63] H. Deng und et al., „*Science*,“ 1993, 261, 1047.

- 
- [64] W. Stöber und A. Fink, „Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range,“ *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, 26, 62-69.
- [65] C. Brinker und W. Scherer, *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego, 1990.
- [66] A. Schilman, *Synthese multifunktionaler Nanopartikel zur Anwendung in der Theranostik*, 2011, Diplomarbeit, Universität Mainz.
- [67] T. Schladt, K. Schneider, S. Prüfer, H. Bauer, F. Natalio, O. Dumele, R. Raidoo, S. Weber, L. Schreiber, M. Radsak, H. Schild und W. Tremel, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 9253-9262.
- [68] M. Vallet-Regi, A. Ramila, R. Real und J. Perez-Pariente, *Chem. Mater.*, 2001, 13, 308-311.
- [69] J. Beck, J. Vartuli und W. Roth, *Journal of the Am. Chem. Society*, 1992, 114, 10834-10843.
- [70] T. Shin, *The Self-Assembly of Surfactants in ordered mesoporous Silica, studied by Neutron Scattering*, 2010, Dissertation, Technische Universität Berlin.
- [71] Q. Instruments, Autosorb AS-3B & AS-6B, Multistation Gas Sorption System, MANUAL, P/N 05063 Rev B, Quantachrome Instruments © 2004, 2004.
- [72] E. Anglin, L. Cheng und M. Sailor, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1266-1277.
- [73] Q. Yang, S. Wang, P. Fan, L. Wang, K. Lin und F. Xiao, *Chem. Mater.*, 2005, 17, 5999-6003.
- [74] C. Ashley, C. Brinker und et al., *American Chemical Society*, 2012, 6, 2174-2188.
- [75] M. Mizutani, Y. Yamada, T. Nakamura und K. Yano, *Chem. Mater.*, 2008, 20, 4777-4782.
- [76] S. Zhu und e. al, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2004, 39, 179-187.
- [77] C. Kneuer und e. al., *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 926-932.
- [78] D. Luo und e. al, *J. Controlled Release*, 2004, 95, 333-341.
- [79] M. N. V. Ravi Kumar und e. al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2004, 4, 876-881.
- [80] V. Wilms, H. Bauer, C. Tonhauser, A. Schilman, M. Müller, W. Tremel und H. Frey, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 193-199.
- [81] T. Schladt, K. Koll, S. Prüfer, H. Bauer, F. Natalio, O. Dumele, R. Raidoo, S. Weber, U. Wolfsum, L. Schreiber, M. Radsak, H. Schild und W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22, 9253-9262.
- [82] J. Kim, T. Hyeon und e. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 8438-8441.

- [83] „Bracco Imaging,“ [Online]. Available: [http://www.braccoimaging.com/sites/braccoimaging.com/files/technica\\_sheet\\_pdf/006965Imeron\\_150.pdf](http://www.braccoimaging.com/sites/braccoimaging.com/files/technica_sheet_pdf/006965Imeron_150.pdf). [Zugriff am 11 06 2014].
- [84] „Radiologie Bayer,“ [Online]. Available: <http://www.radiologie.bayer.de/media/upload/files/2013/07/16/002744.pdf>. [Zugriff am 11 06 2014].
- [85] J. Pelka, H. Gehrke, M. Esselen, M. Türk, M. Crone, S. Bräse, T. Muller, T. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen und D. Marko, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22, 649-659.
- [86] K. Mayrhofer, M. Arenz, B. Blizanac, V. Stamenkovic, P. Ross und N. Markovic, *Electrochimica Acta*, 2005, 50, 51445154.
- [87] M. Eck und S. Sprang, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 17595-17605.
- [88] „<http://www.rcsb.org/pdb/>,“ Protein Data Base, [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1TNF&bionumber=1>. [Zugriff am 2014].
- [89] „[www.rcsb.org](http://www.rcsb.org/),“ Protein Data Bank, [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TNF>. [Zugriff am 2014].
- [90] B. Ingelheim, „Gebrauchsinformation Beromun(R) 1mg/5mL (Hersteller: BI, Wien),“ BI, Ingelheim, 2009.
- [91] „[www.rcsb.org](http://www.rcsb.org/),“ Protein Data Bank, [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1M47>. [Zugriff am 2014].
- [92] E. Gyenge, X. Darphin, A. Wirth, A. Pieves, H. Walt, M. Bredell und C. Maake, *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9:32, 1-14.
- [93] B. Perez-Ordenez, M. Beauchemin und R. Jordan, „Rev“ *J. Clin. Pathol.*, 2006, 59, 445-453.
- [94] Z. Amir, S. Kwan, D. Landes, T. Feber und S. William, *Eur. J. Cancer Care*, 1999, 8, 198-203..
- [95] K. Hunter, E. Parkinson und P. Harrison, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5, 127-135..
- [96] S. Marur und A. Forastiere, *Mayo. Clin. Proc.*, 2008, 83, 489-501.
- [97] J. Vermorken und P. Specenier, *Ann. Oncol.*, 21, (Suppl 7), vii252-vii261.
- [98] R. Kiesslich, J. Burg, M. Vieth, P. Galle und M. Neurath, *Konfokale Laserendoskopie: Eine neue Technik zur Beurteilung zellulärer Strukturen während der Koloskopie*, Thieme, 2004.

- 
- [99] B. Pogorzelski, U. Hanenkamp, M. Goetz, R. Kiesslich und J. Gosepath, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 138, 404-411..
- [100] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi und H. Kitano, *Molecular Systems Biology*, 2005, 1, PMC1681462.
- [101] F. Ciardiello e. al., *Onkologie - Int. J. for Cancer Research and Treatment* , 2005, 28, 18-24.
- [102] W. Hartmann, N. Saptharishi, X. Yang, G. Mitra und G. Soman, *Analytical Biochemistry*, 2004, 325, 227-239.
- [103] R. Stamper, M. Lieberman und M. Drake, *Elsevier Health Science*, 2009, 47-50.
- [104] A. B. Julia Heim, „Anfärbung des EGF-Rezeptors von HNSC-Zellen“ 2014.
- [105] S. Reuter, A. Heinz, M. Sieren, R. Wiewrodt, E. Gelfand, M. Stassen, R. Buhl und C. Taube, *European Respiratory Journal*, 2008, 31, 773-782.
- [106] P. Gettins, A. Patston und M. Schapira, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1992, Band 6, 1393-1408.
- [107] G. Silverman und et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 33293-33296.
- [108] „www.rcsb.de,“ Protein Data Bank, [Online]. Available: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OVA>. [Zugriff am 2014].
- [109] E. Daro und et al., *J. Immunol.*, 2000, 165, 49-58.
- [110] L. Santambrogio, A. Sato und L. Stern, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 15056-15061.
- [111] I. Raynal, P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebuzzi und C. Corot, *Invest. Radiol.*, 2004, 39, 56-63.
- [112] Y. Wang, J. Zhu, J. Han und R. Guo, *Nanotechnology*, 2008, 19, 1-8.
- [113] Y. Luo, *Materials Letters*, 2007, 61, 1893-1895.
- [114] Y. Chen, H. Chen, Q. He, F. Chen, J. Zhou, J. Feng und J. Shi, *ACS Nano*, 2010, 4, 529-539.
- [115] L. You, T. Wang und J. Ge, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 2142-2149.
- [116] J. Ye, H. Zhang, R. Yang, X. Li und L. Qi, *small*, 2010, 6, 296-306.
- [117] PDF-2, Release 2004, JCPDS – International Centre for diffraction Data.
- [118] EVA 10.0, Bruker AXS, Madison, WI, USA (2004).

- [119] V. Wilms, H. Bauer, C. Tonhauser, A. Schilman, M. Müller, W. Tremel und H. Frey, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 193-199.
- [120] V. Reuss, B. Obermeier, C. Dingels und H. Frey, *Macromolecules*, 2012, 45, 4581 - 4589.
- [121] H. Lee, S. Dellatore, W. Miller und P. Messersmith, *Science*, 2007, 318, 426-430.
- [122] J. Waite und M. Tanzer, *Science*, 1981, 212, 1038-1040.
- [123] T. Schladt, K. Schneider, M. Shukoor, F. Natalio, H. Bauer, M. Tahir, S. Weber, L. Schreiber, H. Schröder, W. Müller und W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20, 8297-8304.
- [124] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou und S. Sun, *Advanced Materials*, 2007, 19, 3163-3166.
- [125] C. Dingels, M. Schömer und H. Frey, *Chemie unserer Zeit*, 2011, 45, 338-349.
- [126] M. Ward und T. Georgiou, *Polymers*, 2011, 3, 1215-1242.
- [127] B. Obermeier, F. Wurm, C. Mangold und H. Frey, *Angew. Chemie*, 2011, 123, 8136-8146.
- [128] M. Imran ul-haq, B. Lai, R. Chapanian und J. Kizhakkedathu, *Biomat.*, 2012, 33, 9135-9147.
- [129] C. Haynes, A. McFarland, L. Zhao, R. Van Duyne und G. Schatz, *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, 7337-7342.
- [130] C. Murray, C. Kagan und M. Bawendi, *Annual Rev. of Materials Science*, 2000, 30, 545-610.
- [131] S. Chou, Y. Shau, P. Wu, Y. Yang, D. Shieh und C. Chen, *JACS*, 2010, 132, 13270-13278.
- [132] C. Xu, Z. Yuan, N. Kohler, J. Kim, M. Chung und S. Sun, *JACS*, 2009, 131, 15346-15351.
- [133] K. Watanabe, D. Menzel, N. Nilius und H. Freund, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 4301-4320.
- [134] J. Kim, C. Rong, J. Ping Liu und S. Sun, *Advanced Materials*, 2009, 21, 906-909.
- [135] M. Chen, J. Kim, J. Liu, H. Fan und S. Sun, *JACS*, 2006, 128, 7132-7133.
- [136] E. Roduner, *Nanospectroscopic Materials: Size-Dependent Phenomena*, Cambridge: RCS Publishing, 2006.
- [137] H. Goesmann und C. Feldmann, *Angewandte Chemie*, 2010, 122, 1402-1437.
- [138] W. Schulemann, *Angewandte Chemie*, 1940, 53, 342-345.
- [139] D. Leslie-Pelecky und R. Rieke, *Chem. Mater.*, 1996, 8, 1770-1783.
- [140] A. Lu, E. Salabas und F. Schüth, *Angewandte Chemie*, 2007, 119, 1241-1266.

- 
- [141] R. Winter und F. Noll, Methoden der biophysikalischen Chemie, Stuttgart: Teubner, 1998.
- [142] H. Zeng und S. Sun, *Advanced Functional Materials*, 2008, 18, 391-400.
- [143] C. Kaewsaneha, P. Tangboriboonrat, D. Polpanich, M. Eissa und A. Elaissari, *Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5, 1857-1869.
- [144] C. Wang, H. Yin, S. Dai und S. Sun, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 3277-3282.
- [145] H. Zeng, S. Sun, J. Li, Z. Wang und J. Liu, *Applied Physics Letters*, 2004, 85, 792-794.
- [146] P. Sajalal, T. Sreepasad, A. Samal und T. Pradeep, *Nano Reviews*, 2011, 2, 5883-DOI: 10.3402/nano.v2i0.5883.
- [147] H. Yu, M. Chen, P. Rice, S. Wang, R. White und S. Sun, *Nano Letters*, 2005, 2, 379-382.
- [148] A. Figuerola, A. Fiore, R. Di Corato, A. Falqui, C. Giannini, E. Micotti, A. Lascialfari, M. Corti, R. Cingolani, T. Pellegrino, P. Cozzoli und L. Manna, *JACS*, 2008, 130, 1477-1487.
- [149] Z. Wang, *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 1153-1175.
- [150] N. Frey und S. Sun, in *Inorganic Nanoparticles - Synthesis, Applications and Perspectives*, Boca Raton, Florida, CRC Press, 2010, pp. 33-68.
- [151] S. Maksimuk, S. Yang, Z. Peng und H. Yang, *JACS*, 2007, 129, 8684-8685.
- [152] L. Bao, W. Low, J. Jiang und J. Ying, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 7117-7120.
- [153] Q. Xiao, M. Cai, M. Balogh, M. Tessema und Y. Lu, *Nano Res.*, 2012, 5, 145-151.
- [154] S. Tanaka, K. Aoki, A. Marutsugu, H. Ishitobi, T. Jin und Y. Inouye, *Optical Materials Express*, 2013, 3, 157-165.
- [155] M. Yu, S. Huang, K. Yu und A. Clyne, *Int. J. of Molecular Sciences*, 2012, 13, 5554-5570.
- [156] L. Shen, P. Laibinis und T. Hatton, *Langmuir*, 1999, 15, 447-453.
- [157] K. Koll, „Dissertation,“ Mainz, 2011.
- [158] Z. Amoozgar und Y. Yeo, *Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2012, 4, 219-233.
- [159] A. Hofmann, F. Wurm und H. Frey, *Macromolecules*, 2011, 44, 4648-4657.
- [160] M. Sousa, F. Tourinho, J. Depuyrot, G. da Silva und M. Lara, *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105, 1168-1175.
- [161] W. Sun, S. Zhou, B. You und L. Wu, *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, 10646-10654.

- [162] W. Stöber, A. Fink und E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, 26, 62-69.
- [163] A. Voigt und K. Sundmacher, *Chemie Ingenieur Technik*, 2007, 79, 229-232.
- [164] Morales-Avila, E.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-Garcia, B.; Ramirez, F.;, Radiolabeled Nanoparticles for Molecular Imaging, *Molecular Imaging*, Prof. Bernhard Schaller (Ed.), InTech , 2012, pp. 15-38.
- [165] R. Nicholson, J. Gee und M. Harper, *European Journal of Cancer*, 2001, 37, 9-15.
- [166] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja und J. Grobelny, *Journal of Nanomaterials*, 2013, 2013, Article ID 313081, 10 pages, doi:10.1155/2013/313081.
- [167] F. Natalio, A. Kashyap, S. Lorenz, H. Kerschbaumer, M. Tahir, K. Koynov, H. Duschner, S. Strand, D. Strand und W. Tremel, *Nanoscale*, 2012, 4, 4680-4686.
- [168] A. Thomas, H. Bauer, A. Schilman, K. Fischer, W. Tremel und H. Frey. to be submitted.
- [169] H. Gong, L. Sampath, J. Kovar und D. Olive, Targeting EGFR and HER2 for Molecular Imaging of Cancer, *Molecular Imaging*, Prof. Bernhard Schaller (Ed.), InTech, 2012.
- [170] E. Ditzendorf, T. Hany, A. Buck, G. von Schulthess und C. Burger, *Journal of Nuclear Medicine*, 2003, 44, 732-738.
- [171] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindmann, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, A. Dawson und S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 2050-2055.
- [172] F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo und P. Couvreur, *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16, 1181-1188.
- [173] Y. Zhang, N. Kohler und M. Zhang, *Biomaterials*, 2002, 23, 1553-1561.
- [174] Q. Pankhurst, J. Connolly, S. Jones und J. Dobson, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003, 36, R167-R181.
- [175] J. Zhu, Y. Lu, Y. Li, J. Jiang, Z. Liu, L. Guo, Y. Pan und H. Gu, *Nanoscale*, 2014, 6, 199-202.
- [176] I. Izquierdo-Barba, A. Martinez, A. Doadrio, J. Pérez-Pariente und M. Vallet-Regí, *Europ. J. of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 26, 365-373.
- [177] M. Vallet-Regí, L. Ruiz-González, I. Izquierdo-Barba und J. González-Calbet, *J. Mater. Chem.*, 2006, 16, 26-31.
- [178] R. Lawaczeck, M. Menzel und H. Pietsch, *Applied Organometallic Chem.*, 2004, 18, 506-513.
- [179] L. Cademartiri und G. Ozin, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 1013-1020.



- 
- [180] A. Avdeef, S. Sofen, T. Bregante und K. Raymond, *JACS*, 1978, 100, 5362-5370.
- [181] R. Hong, N. Fischer, T. Emrick und V. Rotello, *Chem. Mater.*, 2005, 17, 4617-4621.
- [182] S. Colodrero, M. Ocana und H. Miguez, *Langmuir*, 2008, 24, 4430-4434.
- [183] D. Maschke, „Dissertation,“ Mainz, 2010.
- [184] B. Terris und T. Thomson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, 38, R199-R222.
- [185] R. Narayanan und M. El-Sayed, *Nano Letters*, 2004, 4, 1343-1348.
- [186] L. Zhao, T. Chano, S. Morikawa, Y. Saito, A. Shiino, S. Shimizu, T. Maeda, T. Irie, S. Anonuma, H. Okabe, T. Kimura, T. Inubushi und N. Komatsu, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, 22, 5107-5117.
- [187] M. Li, K. Neoh, R. Wang, B. Zong, J. Tan und E. Kang, *Eur. J. Pharm.*, 2013, 48, 111-120.
- [188] L. Zhou, C. Gao, X. Hu und W. Xu, *Chem. Mater.*, 2011, 23, 1461-1470.
- [189] F. Igney und P. Kramer, *J. of Leuk. Biol.*, 2002, 71, 907-920.
- [190] S. Hori, T. Nomura und S. Sakaguchi, *Science*, 2003, 299, 1057-1061.
- [191] M. Johannsen, B. Thiesen, U. Gneveckow, K. Taymoorian, N. Waldöfner, R. Scholz, S. Deger, K. Jung, S. Loening und A. Jordan, *The Prostate*, 2006, 66, 97-104.
- [192] L.-. Rink, A. Kruse und H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag , 2012.
- [193] N. Glube, A. Giessl und P. Langguth, *Nephron Exp. Nephrol.*, 2007, 107, e47-e56.
- [194] S. Anoopkumar-Dukie, J. Carey, T. Conere, E. O’Sullivan, F. van Pelt und A. Allshire, *The British Journal of Radiology*, 2005, 78, 945-947.

## C. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell von LaMer und Dinegar. Konzentrationsverlauf einer schwerlöslichen Verbindung von der Keimbildung bis hin zum Partikelwachstum. <sup>[20]</sup> .....	8
Abbildung 2: Schema zum Wachstum und zur Stabilisierung von Nanopartikeln. ....	9
Abbildung 3: TEM-Aufnahmen von Platinnanopartikeln nach Wang <i>et al.</i> [25] .....	11
Abbildung 4: TEM-Aufnahme von MnO <sub>2</sub> -Nanopartikeln aus einer Fällungsreaktion. (Eigene Ergebnisse) .....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Zelltypen des Immunsystems. Die innere Linie stellt den Zellkern dar, die äußere Linie die Zellmembran und die Punkte die Granula.....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer direkten Krebszellenadressierung durch Nanopartikel. ....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer möglichen indirekten Ansteuerung von Krebszellen mit Nanopartikeln. Eine Ansteuerung von B-Zellen kommt zum Beispiel bei CD4-T <sub>H</sub> 2-Zellen vor. Andere T-Zellen würden sich an dieser Stelle zum Beispiel zu T-Effektorzellen entwickeln, die wiederum verschiedene Funktionen besitzen können. ....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung A: eines sphärischen Janus-Partikels und B: einer orthogonalen Funktionalisierung eines Heterodimers mit zwei PEG-Liganden, welche verschiedene Ankergruppen tragen. ....	26
Abbildung 9: Mögliches Schema zum Wachstum von Heterodimeren. <sup>[56]</sup> .....	27
Abbildung 10: TEM-Aufnahmen von MnO-Nanopartikeln.....	29
Abbildung 11: Pulverröntgendiffraktogramm von A: MnO- (Manganosit) und B: Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikeln (Hausmannit). ....	29
Abbildung 12: A, B: TEM-Aufnahmen und C: Röntgendiffraktogramm von Platinpartikeln.....	31
Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt@MnO-Heterodimerpartikeln mit unterschiedlich großen Manganoxidomänen. A, B: 4±1 nm (Domänenverhältnis 1:1), C: 8±1 nm (1:2), D: 12±2 nm (1:3), E: 16±2 nm (1:4) und F: 20±2 nm (1:5). ....	32
Abbildung 14: Schematische Darstellung des klassischen Sol-Gel-Prozesses im Vergleich zur Silicananopartikelbildung. <sup>[65]</sup> .....	34
Abbildung 15: Hydrolyse und Polykondensation eines Siliziumalkoxid zu einem SiO <sub>2</sub> -Partikel. Die fertigen Partikel tragen Hydroxylgruppen, an denen keine weitere Polykondensation stattgefunden hat, auf der Oberfläche. ....	35
Abbildung 16: Mechanismus der sauren und basischen Katalyse.....	36
Abbildung 17: Röntgendiffraktogramm von SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln. Schwarz: Experiment, rot: Anpassung, blau: Differenz. <sup>[66]</sup> .....	37
Abbildung 18: Schematische Darstellung der reversen Mikroemulsion und chemische Strukturformel von Igepal <sup>®</sup> CO-520. ....	38
Abbildung 19: Strukturformel und schematische Darstellung von CTAB.....	38

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Mizellenanordnung und der Silicabildung um die "Platzhalter Mizellen" .....	39
Abbildung 21: Röntgendiffraktogramm von mesoporösen SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln. Schwarz: Experiment, rot: Anpassung, blau: Differenz. $d_{100} = 37,2 \text{ \AA}$ , $d_{110} = 22,8 \text{ \AA}$ , $d_{200} = 19,8 \text{ \AA}$ und $d_{210} = 15,2 \text{ \AA}$ , $a = 43 \text{ \AA}$ . <sup>[66], [70]</sup> .....	40
Abbildung 22: Schematische Darstellung der APS-Funktionalisierung der Silicananopartikel. ....	41
Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiO <sub>2</sub> -Partikeln in verschiedenen Größen, die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden. A: Raumtemperatur (~ 450 nm), B: 35°C (~ 150 - 200 nm), C: 65°C (~ 100 - 120 nm), D: 75°C (~ 40 - 60 nm). ....	42
Abbildung 24: TEM-Aufnahmen von Partikeln, die unter der kritischen pH-Wert Grenze (A und B) und über pH <sub>krit</sub> (C) synthetisiert wurden. ....	43
Abbildung 25: TEM-Aufnahmen von SiO <sub>2</sub> -Partikeln in Abhängigkeit des pH-Wertes der Reaktion, bei zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen. A und B: Zugabe von 1 mL (~ 50 nm) und 1,5 mL NH <sub>4</sub> OH (~ 100 nm) bei einer Reaktionstemperatur von 65°C, C und D: Zugabe von 0,8 mL (~ 80 nm) und 0,9 mL NH <sub>4</sub> OH (~ 150 nm) bei einer Reaktionstemperatur von 45°C. ....	44
Abbildung 26: TEM-Aufnahmen von Silicananopartikeln in verschiedenen Größen zwischen 50 und über 400 nm (A~50 nm, B~100 nm, C~120 nm, D~320 nm, E~400 nm) und eine SEM Aufnahme (F) von 400 nm großen Silicananopartikeln. Größe- und Form der Partikel wurden über die Temperatur und den pH-Wert der Reaktion gesteuert. ....	45
Abbildung 27: SiO <sub>2</sub> -Partikel aus der reversen Mikroemulsion in zwei verschiedenen Größen. A-C: 45 nm, D-E: 30 nm. Zusätzlich zeigen alle Aufnahmen die Bildung von dichtesten Kugelpackungen und Überstrukturen in unterschiedlichen Bereichen der TEM-Grids. ....	47
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln in den vier verschiedenen einstellbaren Größen. A: 25 nm, B: 35 nm, C: 45 nm und D: 60 nm. ....	48
Abbildung 29: Mesoporöse SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel in verschiedenen Größen. In Abbildung C ist mit den weißen Linien die Porenstruktur in Längsrichtung der Partikel angedeutet. ....	49
Abbildung 30: IR-Spektrum von mSiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln mit und ohne CTAB. ....	50
Abbildung 31: Isotherme aus der Gasadsorptionsmessung von mSiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln. ....	51
Abbildung 32: A: BET-Gerade zur Bestimmung der Partikeloberfläche. B: Porengrößenverteilung der Partikelporen. ....	51
Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiO <sub>2</sub> @mSiO <sub>2</sub> -Partikeln.....	52
Abbildung 34: Zytotoxizitätstest von mSiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln an dendritischen Zellen (Inkubationszeit von 24 h, Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz).....	53
Abbildung 35: Wirkstoffabgabepprofile von A: Acetylsalicylsäure, B: Ibuprofen, C: Diclofenac und D: Novalgine <sup>®</sup> . ....	54
Abbildung 36: Wirkstoffabgabepprofile bei drei verschiedenen Temperaturen. ....	55
Abbildung 37: Modell zur Bildung einer Silicahülle über die reverse Mikroemulsion. ....	61
Abbildung 38: A, B: TEM-Aufnahmen von MnO@SiO <sub>2</sub> -Partikeln mit unterschiedlich dicken Silicahüllen und C: MnO-Partikel gelöst in Hexan (links) im Vergleich zu MnO@SiO <sub>2</sub> -Partikeln gelöst in Wasser (rechts). ....	62

Abbildung 39: Agglomeration der in $\text{CHCl}_3$ gelösten $\text{MnO}$ -Partikel vor der Bildung der $\text{mSiO}_2$ Hülle führt zu „Multikern“- $\text{MnO@mSiO}_2$ -Mikropartikeln. ....	63
Abbildung 40: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\text{MnO@mSiO}_2$ -Partikeln. ....	64
Abbildung 41: A-F: Aufnahmen von $\text{MnO@mSiO}_2$ -Kern-Schale-Partikeln mit unterschiedlich dicker poröser Hülle. Von A bis F wird über die pH-Wert Veränderung in der Reaktion die Silicaschicht immer größer (Zugabe von 0,05 – 0,3 mL, 2M Natronlauge). G und H: Einfluss auf die Synthese bei leicht sauren pH-Werten (Zugabe von 0,05 – 0,1 mL Salzsäure). ....	65
Abbildung 42: Langzeitstabilitätsstudie von $\text{MnO}$ -, $\text{MnO@SiO}_2$ - und $\text{MnO@mSiO}_2$ -Nanopartikeln. A, D und G: TEM-Aufnahmen der frisch hergestellten Partikel, B und E: drei Monate gealterte Proben, C und F: sechs Monate gealterte Proben und H: Probe nach einem Jahr. ....	67
Abbildung 43: Zytotoxizitätstest von $\text{MnO@mSiO}_2$ -Nanopartikeln und $\text{MnO@SiO}_2$ -Partikeln (Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz). ....	68
Abbildung 44: A, B: TEM-Aufnahmen von $\text{Pt@MnO@SiO}_2$ -Partikeln, C: Schematische Darstellung der Heterodimerpartikel. ....	69
Abbildung 45: UV-Vis-Spektrum der orthogonalen Funktionalisierung von $\text{Pt@MnO@SiO}_2$ -Nanopartikeln. ....	70
Abbildung 46: A, B: TEM-Aufnahmen von $\text{Au@ZnO@SiO}_2$ -Partikeln, C: $\text{Au@ZnO@SiO}_2$ -Partikel in Wasser (links) und $\text{Au@ZnO}$ -Partikel in Hexan (rechts), D: Schematische Darstellung der $\text{Au@ZnO@SiO}_2$ -Heteropartikel. ....	71
Abbildung 47: Abbildung 18: A-C: TEM-Aufnahmen von $\text{Pt@SiO}_2$ -Partikeln mit unterschiedlich großen Silicadomänen und D: wässrige Lösung von $\text{Pt@SiO}_2$ -Partikeln. ....	72
Abbildung 48: Vorgeschlagenes Modell für die Bildung einer Silicadomäne über die reverse Mikroemulsion. Aufgrund niedrigerer Hydrophilie des Platins, bleibt dieses in der Mizellenwand „hängen“ und es bilden sich $\text{Pt@SiO}_2$ -Heterodimere. ....	73
Abbildung 49: UV-Vis-Spektrum der orthogonalen Funktionalisierung von $\text{Pt@SiO}_2$ -Nanopartikeln. ....	74
Abbildung 50: Strukturformeln von A: Imeron <sup>®</sup> und B: Ultravist <sup>®</sup> . ....	75
Abbildung 51: Röntgenabschwächung in Hounsfield Units von $\text{Pt@SiO}_2$ -Heterodimeren, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Kontrastmitteln. Aufgetragen sind die H.U.-Werte der Partikel bei verschiedenen Platinkonzentrationen und die der Kontrastmittel Ultravist <sup>®</sup> und Imeron <sup>®</sup> bei einer Iodkonzentration. A, B: 3D-Aufnahme des Röntgenkontrastes von A: reinem Wasser (dest.) und B: $\text{Pt@SiO}_2$ -Nanopartikeln in Wasser. ....	75
Abbildung 52: Viabilität von dendritischen Zellen in Gegenwart von $\text{Pt@SiO}_2$ -Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen nach 24 h Inkubationszeit. Bestimmung mit Hilfe eines Zytotoxizitätstest (Durchführung durch Monika Bednarczyk, AG Grabbe, Universitätsmedizin Mainz). ....	76
Abbildung 53: Modell zur Zusammenlagerung von $\text{Pt@SiO}_2$ -Partikeln in wässriger Lösung. ....	77
Abbildung 54: Hydrodynamischer Durchmesser von $\text{Pt@SiO}_2$ -Partikeln in Wasser. ....	78
Abbildung 55: Cyclovoltogramm von $\text{Pt@SiO}_2$ -Nanopartikeln. ....	79

Abbildung 56: 3D-Struktur eines TNF $\alpha$ -Trimers <sup>[89]</sup> (links) und schematische Darstellung des Aufbaus eines TNF $\alpha$ -Monomers.....	82
Abbildung 57: Schematische Darstellung der TNF $\alpha$ -Rezeptor Bindung und der ausgelösten Signalkaskade.....	83
Abbildung 58: Schematische Darstellung der T-Zell-Inhibition durch regulatorische T-Zellen. ....	85
Abbildung 59: 3D-Struktur eines Interleukin-2. <sup>[91], [89]</sup> .....	86
Abbildung 60: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA. ....	87
Abbildung 61: ELISA-Platte (96-well-Platte) eines Sandwich-ELISA, nach der Zugabe von Schwefelsäure (Reaktionsstopp). So kann die Platte in einem <i>Platereader</i> ausgelesen werden. In den ersten beiden Spalten ist eine Verdünnungsreihe von TNF $\alpha$ aufgetragen, alle anderen Spalten enthalten verschiedene Proben. Die Spalten ganz rechts sind leer.....	88
Abbildung 62: Aminosäuresequenzen von TNF $\alpha$ und IL-2. <sup>[91]</sup> .....	88
Abbildung 63: Mechanismus der EDC/NHS-Kopplung für die Bindung der Proteine an die Silicananopartikel.....	89
Abbildung 64: TNF $\alpha$ -Bindung an Silicananopartikel. Bestimmung erfolgte über ELISA. ....	91
Abbildung 65: A: Verschiedene Mengen an gebundenem TNF $\alpha$ , mit steigender Aminogruppenzahl auf der Nanopartikeloberfläche und B: Stabilität der TNF $\alpha$ -Bindung auf den Silicapartikeln. Bestimmung erfolgte über ELISA.....	92
Abbildung 66: Bioaktivitätstest der SiO <sub>2</sub> -TNF $\alpha$ -Partikel im Vergleich zu reinem TNF $\alpha$ auf Wehi 164-Zellen. Die TNF $\alpha$ -Menge wird in U/mL angegeben, wobei 1 mg TNF $\alpha$ 6*10 <sup>7</sup> Units entspricht. ....	93
Abbildung 67: Schematische Darstellung des Maustumormodells (oben) und fotografische Aufnahmen von zwei gewachsenen Tumoren auf dem Rücken zweier Mäuse. ....	94
Abbildung 68: Tumorwachstum im Zeitraum von 14 bis 35 Tagen, bei keiner Behandlung und bei Behandlung mit TNF $\alpha$ und SiO <sub>2</sub> -TNF $\alpha$ . ....	95
Abbildung 69: CTLL-2 Proliferationstest. Zugabe von reinem IL-2 im Vergleich zu SiO <sub>2</sub> -IL-2-Nanopartikeln. Die IL-2-Menge wird in U/mL angegeben, wobei 1,1 mg IL-2 18*10 <sup>6</sup> Units entspricht. ....	96
Abbildung 70: Strukturformel des verzweigten Polyethylenimin (links) und schematische Darstellung der Umhüllung der Nanopartikel mit PEI (rechts). ....	97
Abbildung 71: Strukturaufbau eines RNA-Strangs (links) und Silicananopartikel mit einer Polyethyleniminhülle und adsorbierten siRNA-Molekülen (rechts).....	98
Abbildung 72: Verschiedene Gele mit Nanopartikel-siRNA, Reaktionsüberstands- und Stabilitätsproben.....	99
Abbildung 73: Schematische Darstellung eines SiO <sub>2</sub> -Partikel mit Polyethyleniminhülle, siRNA und TNF $\alpha$ (und/oder IL-2) auf der Oberfläche. ....	101
Abbildung 74: Plattenepithelkarzinom im Rachenbereich. <sup>[99]</sup> .....	106
Abbildung 75: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers (z.B.: EGF, R <sub>n</sub> =4,5 nm). ....	107

Abbildung 76: Schematische Darstellung des Mechanismus der EDC/NHS-Kopplung. Bindung einer Carboxylgruppe an eine Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung.....	108
Abbildung 77: Schematische Darstellung der Nanopartikelbindung an die EGF-Rezeptoren des Tumorgewebes. ....	109
Abbildung 78: Schematische Darstellung der Farbstofffunktionalisierung der Nanopartikel. Der Farbstoff FITC kann über seine Isothiocyanatgruppe an die Aminogruppen auf der Partikeloberfläche binden. ....	110
Abbildung 79: Photographie von Silicananopartikeln in Ethanol. Links: ohne FITC, rechts: mit FITC. UV-Vis-Spektrum von SiO <sub>2</sub> -FITC-Partikeln (Absorption von FITC bei 494 nm). ....	111
Abbildung 80: Zellviabilitätstest mit verschiedenen Silicananopartikeln bei fünf verschiedenen Konzentrationen. ....	112
Abbildung 81: Anfärbung von EGFR (FITC/grün) und Zellkern (Dapi/blau) von A: HNSCCUM-01T Zellen und B: HNSCCUM-02T Zellen. <sup>[104]</sup> .....	113
Abbildung 82: Fluoreszenzbildaufnahmen von HNSCCUM-02T-Zellen nach 2 Minuten Inkubationszeit mit 45 nm SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln. A, D: FITC von den Nanopartikeln, B, E: Phalloidin-Alexa Fluor® 555 zur Anfärbung der Zellmembran und C, F: überlagertes Bild.....	114
Abbildung 83: TEM-Aufnahmen von Silicananopartikeln an der Zellmembran.....	115
Abbildung 84: Endoskopaufnahmen von 25 nm SiO <sub>2</sub> -EGFR-Partikeln in A: Tumor- und B: Normalgewebe. ....	116
Abbildung 85: Endoskop-Aufnahmen von 45 nm SiO <sub>2</sub> -EGFR-Partikeln in A: Tumor-, B: Normalgewebe und 45 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln in C: Tumor-, D: Normalgewebe. ....	117
Abbildung 86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Tumordünnschnitten aus Abbildung 4. A: Normal und B: Tumor. ....	118
Abbildung 87: Schematische Darstellung eines Teils der zellulären Bestandteile des Blutes, ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. <sup>[40]</sup> Keine maßstabsgetreue Darstellung der Zellen untereinander. ....	122
Abbildung 88: Schematische Darstellung einer T-Zell-Aktivierung von dendritischen Zellen. ....	124
Abbildung 89: Schematische Darstellung einer Mastzellen-Aktivierung. ....	127
Abbildung 90: 3D-Struktur eines Ovalbumin-Protein. <sup>[108]</sup> .....	128
Abbildung 91: Strukturformel des "SIINFEKL" OVA-Peptidabschnitts.....	128
Abbildung 92: FACS-Aufnahme von dendritischen Zellen, die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Silicananopartikeln inkubiert wurden. ....	130
Abbildung 93: Schematische Darstellung von 25, 45 und 60 nm großen SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -FITC-Partikeln. Mastzellen sind im Vergleich dazu ca. 1000-fach größer. ....	131
Abbildung 94: A: Diagramm der FACS-Analyse von 60 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln, bei 4°C und 37°C B: zusammengefasste Darstellung aller Daten in zwei Balkendiagrammen. Die Daten werden aus dem Anteil von FITC-positiven Mastzellen berechnet. ....	132
Abbildung 95: Schematische Darstellung einer 3D-Berechnung über die Z-Ebenen Aufnahmen im CLSM. ....	133

Abbildung 96: CLSM-Aufnahmen von 25 und 60 nm Silicapartikeln, mit und ohne Serum, bei 4°C und 37°C in Mastzellen. Rot: Zellmembran (CellMask™ Deep Red), grün: Partikel (FITC).....	134
Abbildung 97: Z-Ebenen CLSM-Aufnahmen einer Mastzelle mit 25 nm Silicapartikeln bei 37°C (ohne Serum).....	135
Abbildung 98: Z-Ebenen CLSM-Aufnahmen einer Mastzelle mit 25 nm Silicapartikeln bei 4°C (mit Serum).....	136
Abbildung 99: A: Partikelaufnahme von der Gesamtzellpopulation (alle aus dem Knochenmark generierten Zellen) und B: Partikelaufnahme der dendritischen Zellen (CD11c+). Untersuchung unterschiedlicher Partikelkonzentrationen und -größen mit und ohne Serumpräinkubation. ....	138
Abbildung 100: FACS-Analyse der Partikelaufnahme (25, 45, 60 und 100 nm) in BMDCs (CD11c+) bei 4 und 37°C, mit und ohne Serum nach 3, 6 und 24 h.....	139
Abbildung 101: CLSM-Aufnahmen von A, C: 25 nm und B, D: 100 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln mit BMDCs. Inkubation bei A, B: 4°C und C, D: 37°C ohne Serumpräinkubation. Zellkern: blau (Dapi), Zellmembran: orange (CellMask™ Orange), Partikel: grün (FITC). ....	140
Abbildung 102: CLSM-Aufnahmen von 25 nm und 100 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln mit BMDCs. Inkubation bei 4°C und 37°C mit Serum.....	141
Abbildung 103: Beeinflussung des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen durch die Silicananopartikel.....	143
Abbildung 104: Antigenaufnahme der Zellen (Gesamtzellpopulation) nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.....	144
Abbildung 105: Einfluss von Ovalbumin auf die Partikelaufnahme.....	145
Abbildung 106: Rezeptorexpression (DEC205 und Mannose) von DCs nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.....	146
Abbildung 107: Rezeptorexpression (CD209 und Dectin-1) von DCs nach der Inkubation mit Silicananopartikeln.....	147
Abbildung 108: Partikelaufnahme der Zellen mit und ohne Serumpräinkubation für die Untersuchung der Rezeptorblockade zu untersuchen.....	148
Abbildung 109: Elektronenmikroskopische Aufnahme von hohlen mSiO <sub>2</sub> -Partikeln. ....	XXII
Abbildung 110: TEM Aufnahmen von mesoporösen Silicananostäbchen von einer Länge von 1500 nm (A) bis zu einer Verkürzung zu nahezu quadratischen Partikeln mit einer Kantenlänge von ca. 150 nm (I). A: 0,2 mL TEOS → I: 3 mL TEOS.....	XXIII
Abbildung 111: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von FePt@MnO-Heterodimerpartikeln mit unterschiedlich großen Manganoxiddomänen. A: ~4 nm (Domänenverhältnis^ 1:1), B: ~12 nm (1:3), C: ~16 nm (1:4) und D: ~20 nm (1:5).....	XXIV
Abbildung 112: A: TEM-Aufnahme von Au@SiO <sub>2</sub> -Partikeln und EDX-Daten von B: Pt@SiO <sub>2</sub> und C: Au@SiO <sub>2</sub> .....	XXIV
Abbildung 113: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.....	XXV
Abbildung 114: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln in/auf <i>Knockout</i> -DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.....	XXV

Abbildung 115: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVI
Abbildung 116: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf <i>Knockout</i> -DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVI
Abbildung 117: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVII
Abbildung 118: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln in/auf <i>Knockout</i> -DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVII
Abbildung 119: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVIII
Abbildung 120: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf <i>Knockout</i> -DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXVIII
Abbildung 121: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 und 60 nm großen Silicapartikeln (unfunktionalisiert und funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Wildtyp-Makrophagen bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXIX
Abbildung 122: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 und 60 nm großen Silicapartikeln (unfunktionalisiert und funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf <i>Knockout</i> -Makrophagen bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum. ....	XXIX
Abbildung 123: FACS-Analyse der Reifung von dendritischen Zellen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln.....	XXX
Abbildung 124: FACS-Analyse der Reifung von dendritischen Zellen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 60 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln.....	XXX
Abbildung 125: FACS-Analyse der Reifung von Makrophagen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln.....	XXXI
Abbildung 126: FACS-Analyse der Reifung von Makrophagen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO <sub>2</sub> -Partikeln.....	XXXI
Abbildung 127: Zytotoxizitätstest von nackten, DEC205 funktionalisierten und Kontrollantikörper (Isotype) funktionalisierten SiO <sub>2</sub> -Partikeln (25 und 45 nm, Synthese über die reverse Mikroemulsion). ....	XXXII
Abbildung 128: Zytotoxizitätstest von nackten, DEC205 funktionalisierten und Kontrollantikörper (Isotype) funktionalisierten SiO <sub>2</sub> -Partikeln (25 und 45 nm, Synthese über den Stöber-Prozess). ....	XXXII



---

## D. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergrößerung der Porendurchmesser mit Hilfe von verschiedenen organischen Lösemitteln.....	57
Tabelle 2: Eigenschaften und Klassifizierung der verschiedenen Rezeptoren.....	125
Tabelle 3: Ansatzgrößen zur Darstellung der unterschiedlich großen MnO-Domänen. ....	161
Tabelle 4: Parametertabelle zur Darstellung unterschiedlich großer Silicananopartikel. ....	161
Tabelle 5: Verschiedene Ansatzmengen, für die unterschiedlich großen SiO <sub>2</sub> -Partikel. ....	162
Tabelle 6: Variation der TEOS Menge zur Steuerung der Länge von Nanorods.....	163
Tabelle 7: Ansätze der unterschiedlichen Nanopartikel zu Protein Verhältnisse.....	168

## E. Zusätzliche Ergebnisse

### E. 1. Hohle mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Die MnO@mSiO<sub>2</sub>-Nanopartikel können auch als Vorläuferpartikel für hohle mesoporöse Siliziumdioxidpartikel fungieren. Werden die Partikel zum Beispiel mit Salzsäure behandelt, löst sich der Manganoxidkern ohne Veränderung der Silicastruktur rasch auf. So können Partikel erhalten werden, die zusätzlich zu ihrem porösen Speicher noch einen großen Hohlraum im Kern besitzen, der als weiterer Speicher ausgenutzt werden kann. In Abbildung 109 sind TEM Aufnahmen von diesen hohlen Partikeln dargestellt.

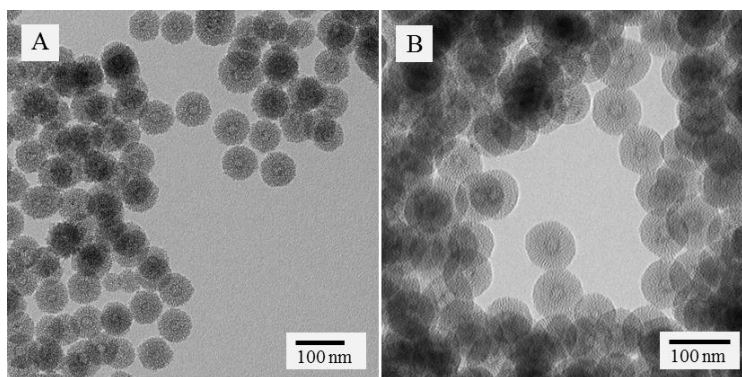


Abbildung 109: Elektronenmikroskopische Aufnahme von hohlen mSiO<sub>2</sub>-Partikeln.

### E. 2. Stäbchenförmige mSiO<sub>2</sub>

Die mesoporösen Silicananopartikel können nicht nur in sphärischer Morphologie hergestellt, sondern es kann auch ein Längenwachstum erreicht werden.<sup>[115], [116]</sup> Die Reaktion findet immer noch im basisch-wässrigen Milieu, mit TEOS als Vorläufermolekül für das SiO<sub>2</sub> statt und zur Bildung der Porenstruktur wurde weiterhin CTAB eingesetzt. Zusätzlich wurde Pluronic<sup>®</sup> F-127, ein nicht-ionisches amphiphiles Triblockcopolymer, bestehend aus zwei Blöcken PEG und einem Block PPG zur Reaktionslösung hinzugegeben.<sup>[115], [116]</sup>

Ohne CTAB konnten keinerlei und ohne Pluronic<sup>®</sup> F-127 konnten keine stäbchenförmigen Nanopartikel, lediglich polydisperse Sphären gewonnen werden. In Anwesenheit des Block-

copolymers konnte mit Erhöhung der TEOS Menge (0,2 bis 3 mL) eine Verkürzung der Stäbchen, von einer Länge von 1500 nm bis zu einer eher würfelförmigen Partikelform mit einer Kantenlänge von 100 – 150 nm erreicht werden. Dieser Verlauf, der Verkürzung der Stäbchen ist in Abbildung 110 dargestellt.

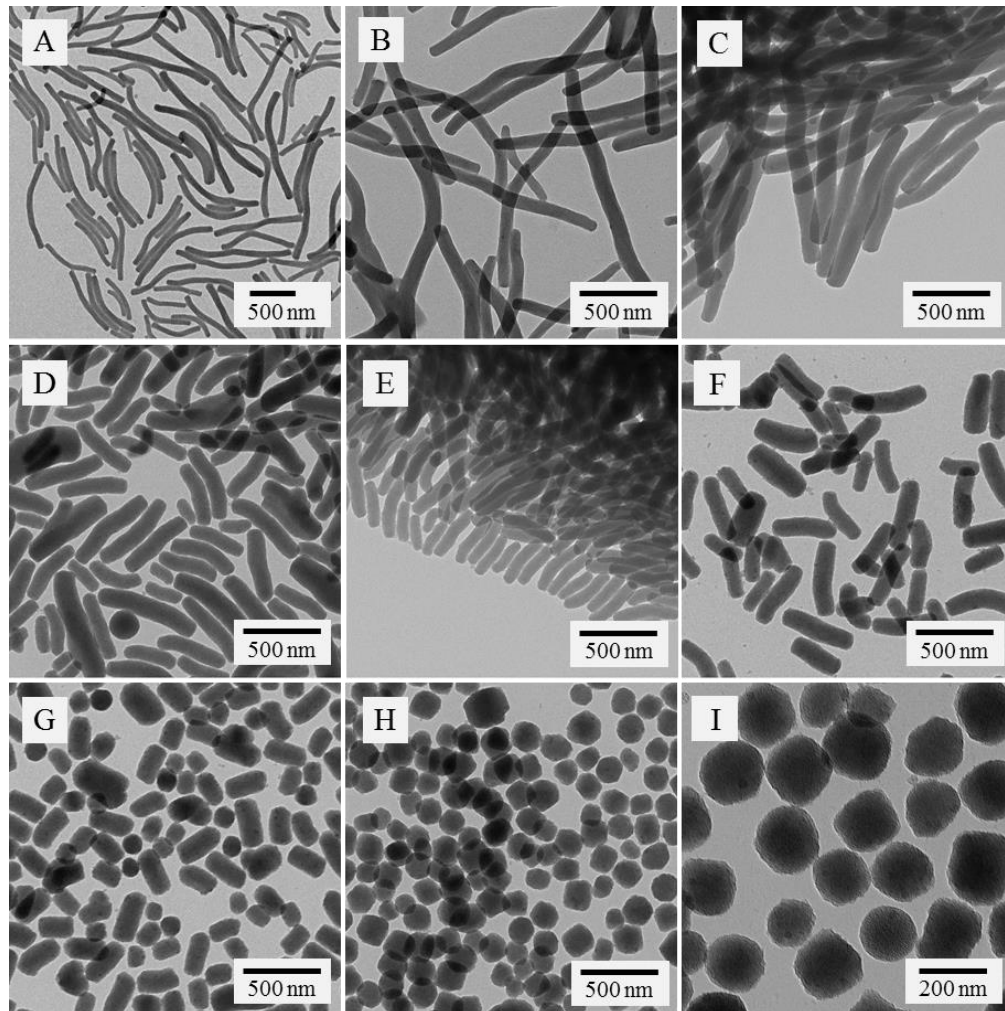


Abbildung 110: TEM Aufnahmen von mesoporösen Silicananostäbchen von einer Länge von 1500 nm (A) bis zu einer Verkürzung zu nahezu quadratischen Partikeln mit einer Kantenlänge von ca. 150 nm (I). A: 0,2 mL TEOS → I: 3 mL TEOS.

### E. 3. FePt@MnO

In Kapitel 3.1.2 wurden die Pt@MnO-Heterodimerpartikel mit verschiedenen großen MnO-Domänen vorgestellt. Die Größensteuerung ist ebenfalls mit FePt@MnO-Partikeln möglich und ist für diese in Abbildung 111 dargestellt.

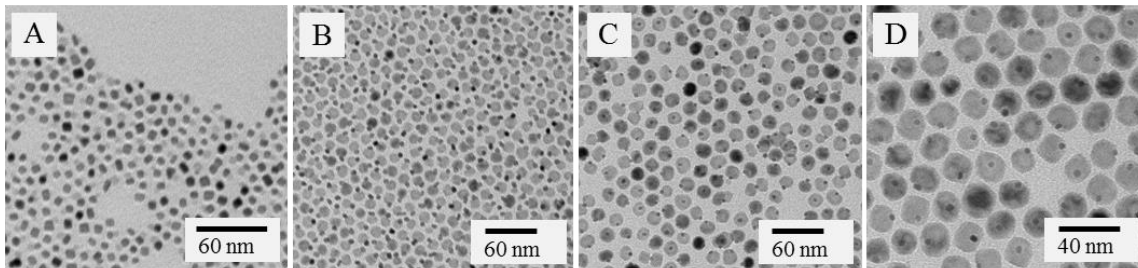


Abbildung 111: TEM-Aufnahmen von FePt@MnO-Heterodimerpartikeln mit unterschiedlich großen Manganoxiddomänen. A: ~4 nm (Domänenverhältnis 1:1), B: ~12 nm (1:3), C: ~16 nm (1:4) und D: ~20 nm (1:5).

### E. 4. Au@SiO<sub>2</sub>-Heterodimer

In Kapitel 3.3.2 wurden die Pt@SiO<sub>2</sub>-Heterodimerpartikel vorgestellt. Solche Heterodimerpartikel konnten auch mit Gold dargestellt werden.

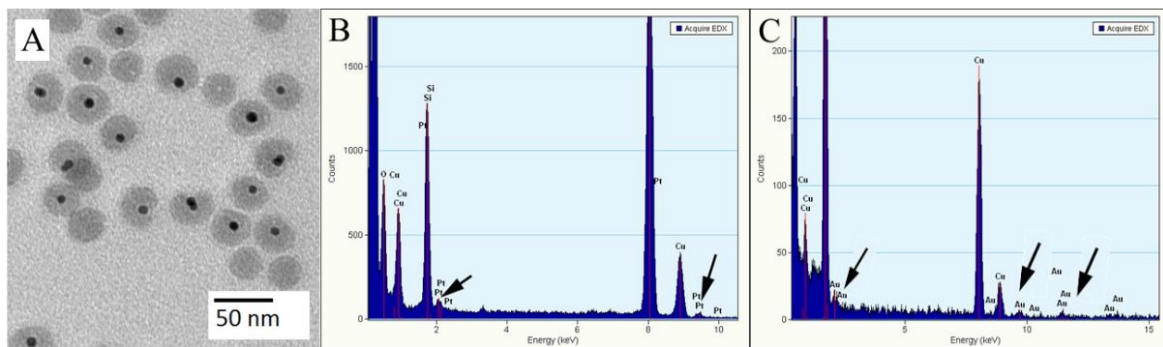


Abbildung 112: A: Elektronenmikroskopische -Aufnahme von Au@SiO<sub>2</sub>-Partikeln und EDX-Daten von B: Pt@SiO<sub>2</sub> und C: Au@SiO<sub>2</sub>.

### E. 5. Einfluss verschiedener Rezeptoren auf die Aufnahme von Silicananopartikeln in DCs und Makrophagen

Hier werden alle Daten, der aus Kapitel 5.2.3 zugrundeliegenden Ergebnisse aufgeführt.

#### 25 nm SiO<sub>2</sub>-Partikel – Wildtyp-DCs

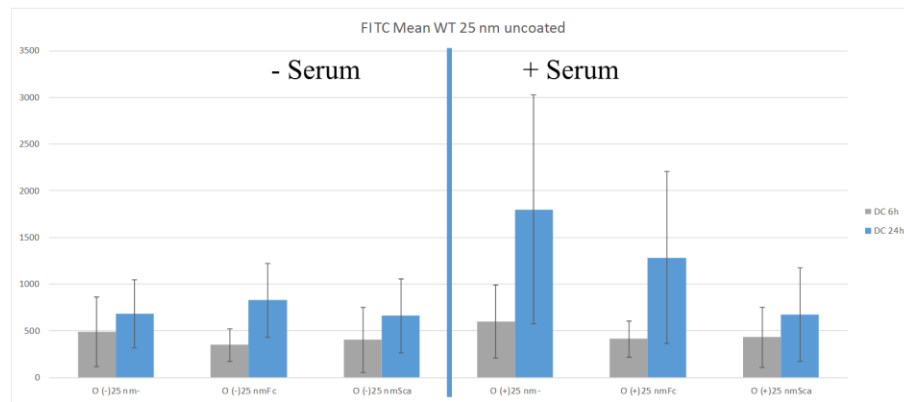


Abbildung 113: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

#### 25 nm SiO<sub>2</sub>-Partikel – *Knockout*-DCs

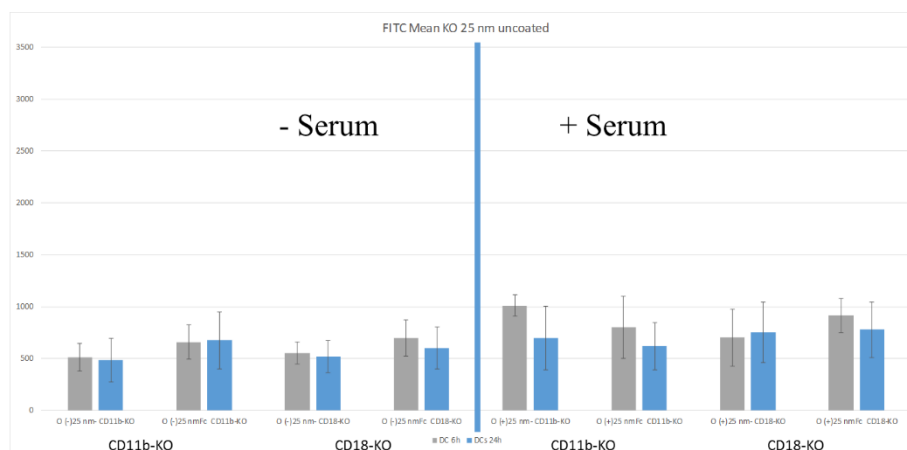


Abbildung 114: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln in/auf *Knockout*-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

## 25 nm SiO<sub>2</sub>-ratIgG1-Partikel – Wildtyp-DCs

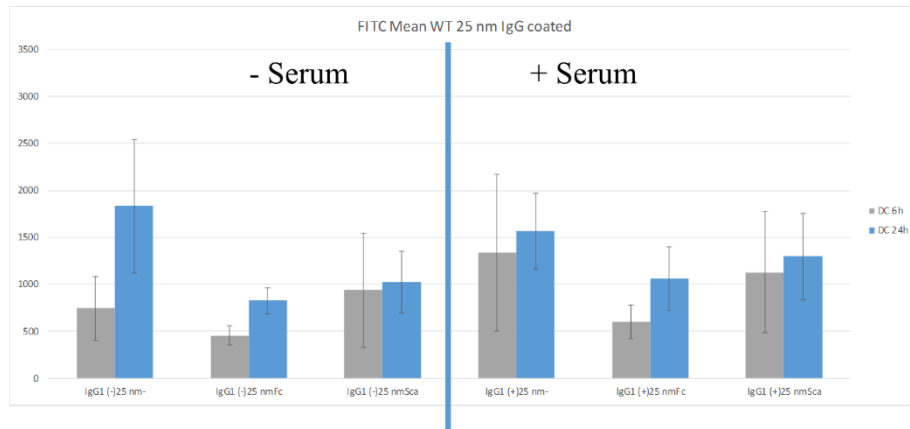


Abbildung 115: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

## 25 nm SiO<sub>2</sub>-ratIgG1-Partikel – *Knockout*-DCs

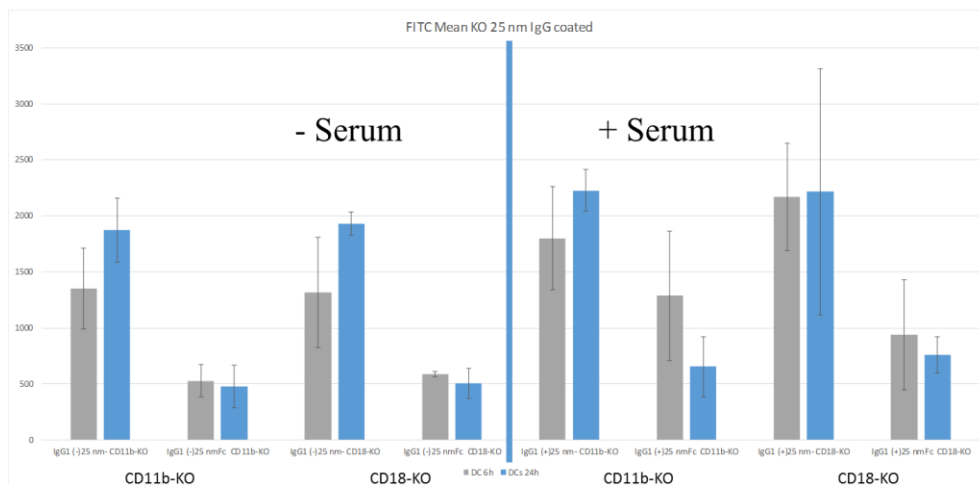


Abbildung 116: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf *Knockout*-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

### 60 nm SiO<sub>2</sub>-Partikel – Wildtyp-DCs

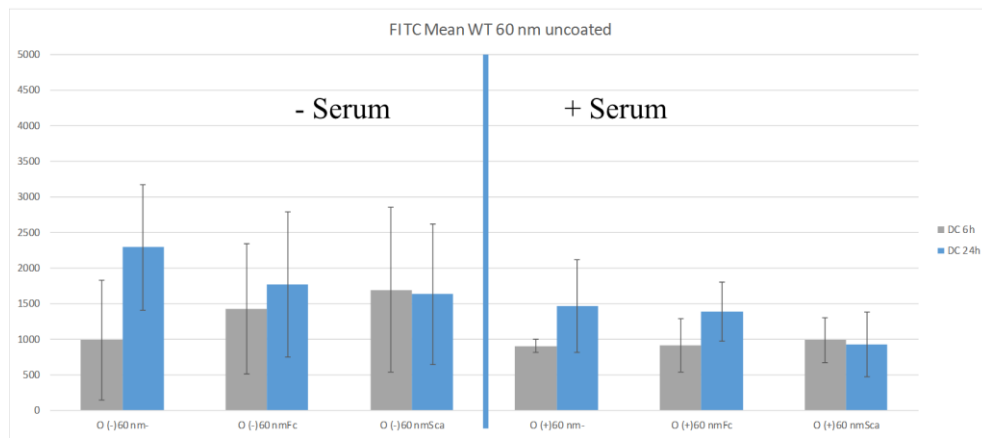


Abbildung 117: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

### 60 nm SiO<sub>2</sub>-Partikel – *Knockout*-DCs

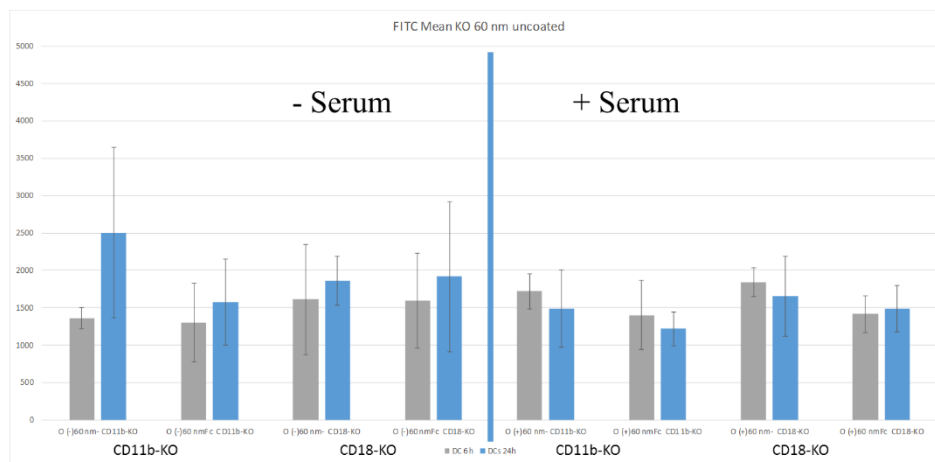


Abbildung 118: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln in/auf Knockout-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

## 60 nm SiO<sub>2</sub>-ratIgG1-Partikel – Wildtyp-DCs

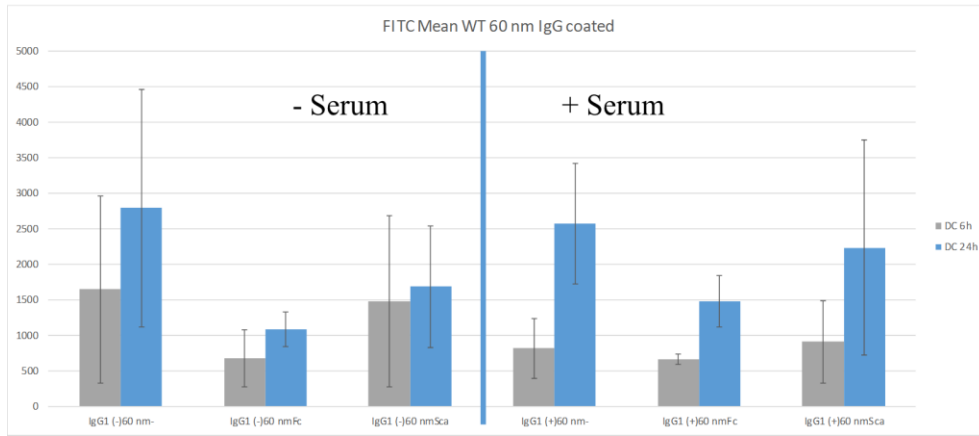


Abbildung 119: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper in/auf Wildtyp-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

## 60 nm SiO<sub>2</sub>-ratIgG1-Partikel – Knockout-DCs

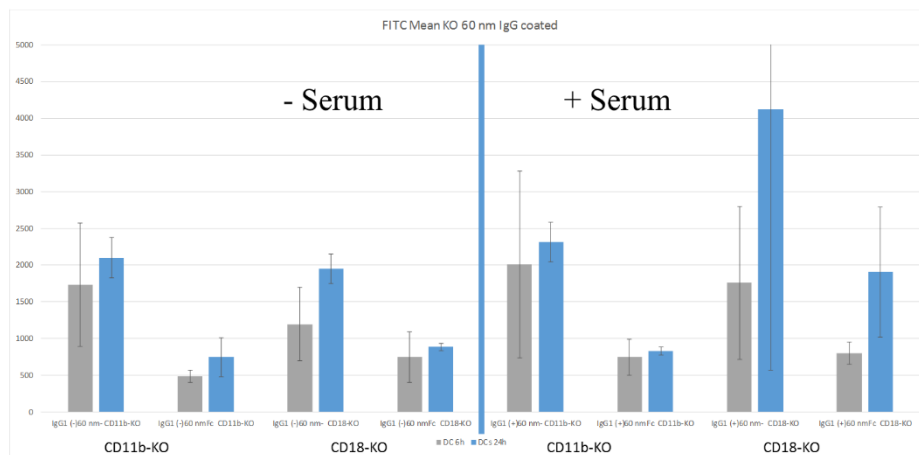


Abbildung 120: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 60 nm großen Silicapartikeln (funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Knockout-DCs bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.



### Partikelbindung/-aufnahme von Wildtyp-Makrophagen

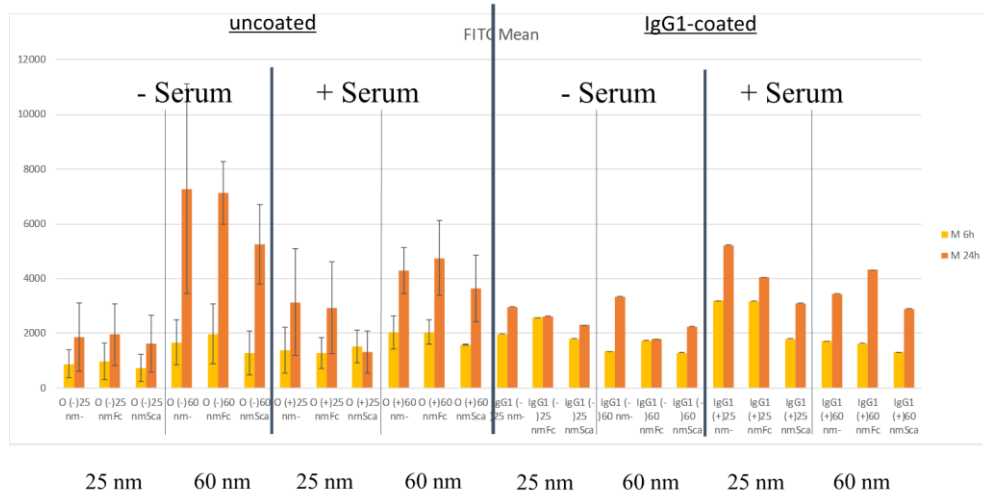


Abbildung 121: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 und 60 nm großen Silicapartikeln (unfunktionalisiert und funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Wildtyp-Makrophagen bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

### Partikelbindung/-aufnahme von *Knockout*-Makrophagen

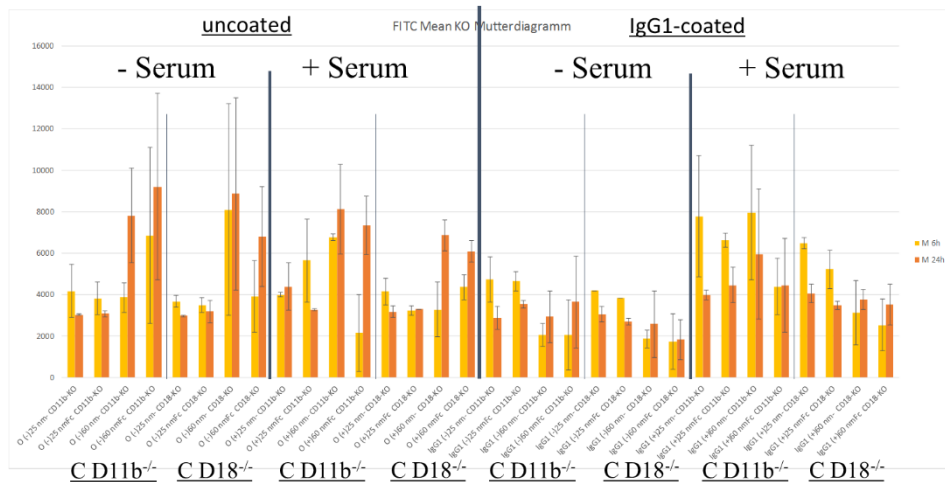


Abbildung 122: FACS-Analyse der Aufnahme/Bindung von 25 und 60 nm großen Silicapartikeln (unfunktionalisiert und funktionalisiert mit einem IgG1(rat)-Antikörper) in/auf Knockout-Makrophagen bei 6 und 24 h, mit und ohne Serum.

## Maturation (Reifung) der DCs (I)

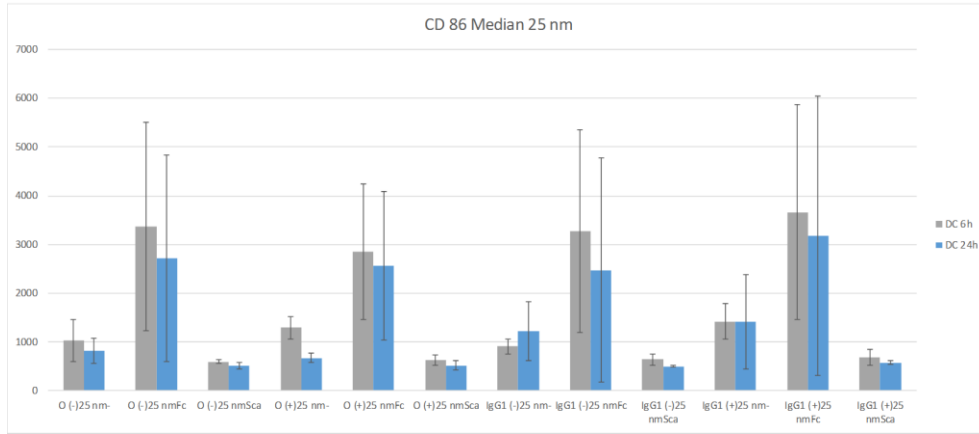


Abbildung 123: FACS-Analyse der Reifung von dendritischen Zellen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln.

## Maturation (Reifung) der DCs (II)

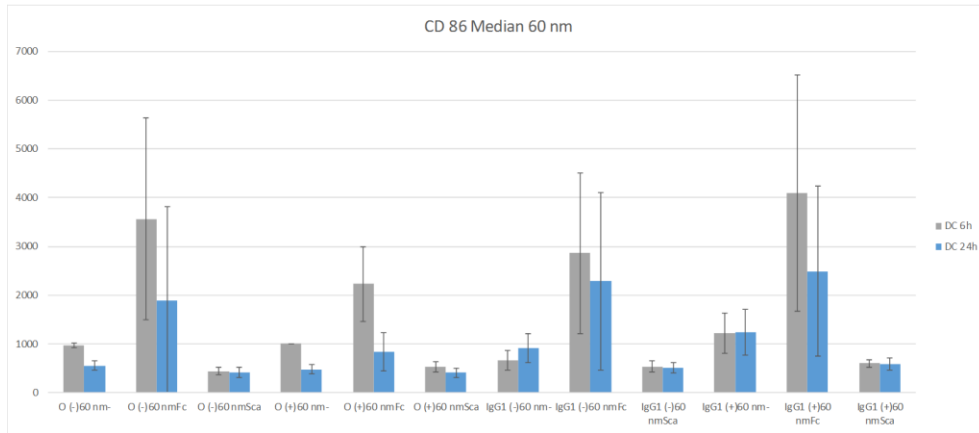


Abbildung 124: FACS-Analyse der Reifung von dendritischen Zellen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 60 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln.

### Maturation (Reifung) der Makrophagen (I)

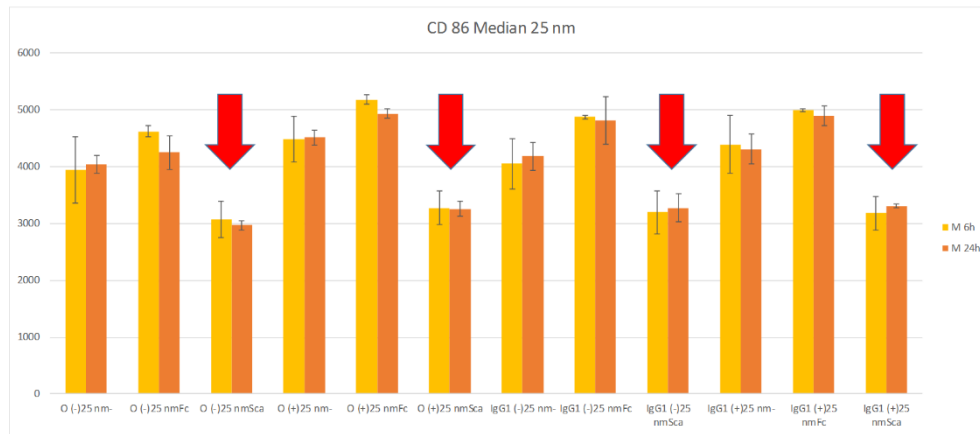


Abbildung 125: FACS-Analyse der Reifung von Makrophagen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln.

### Maturation (Reifung) der Makrophagen (II)

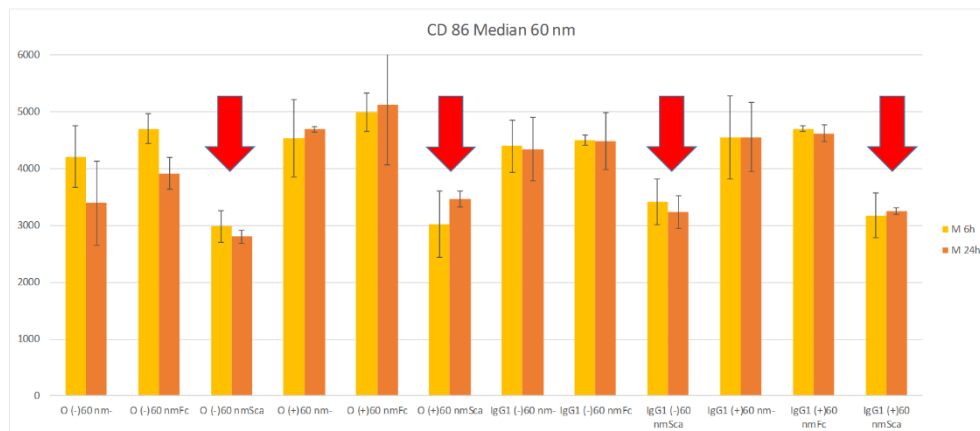


Abbildung 126: FACS-Analyse der Reifung von Makrophagen nach 6 und 24 h, nach der Zugabe von 25 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln.

## E. 6. Toxizitätsstudien von DEC205 gekoppelten SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln

In Kapitel 5 wurde bereits auf die mögliche Kopplung von spezifischen Zielstrukturen an die Silicananopartikel hingewiesen. Dazu wurde der DC spezifische Antikörper anti-DEC205 (+Kontrolle) an die in diesem Kapitel verwendeten Nanopartikel gekoppelt. Anschließend wurden die Partikel auf ihre Toxizität hin überprüft. Alle eingesetzten Partikel besaßen im verwendeten Konzentrationsbereich keine Zytotoxische Wirkung

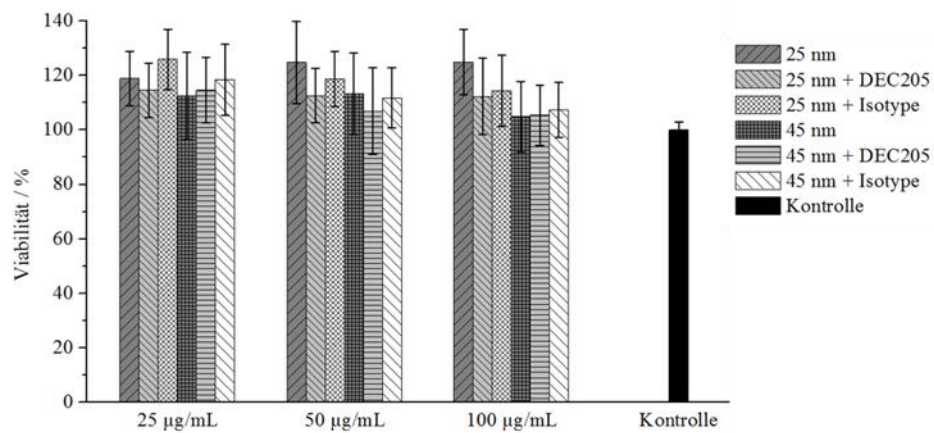


Abbildung 127: Zytotoxizitätstest von nackten, DEC205 und Kontrollantikörper (Isotype) funktionalisierten SiO<sub>2</sub>-Partikeln (25 und 45 nm, Synthese über die reverse Mikroemulsion).

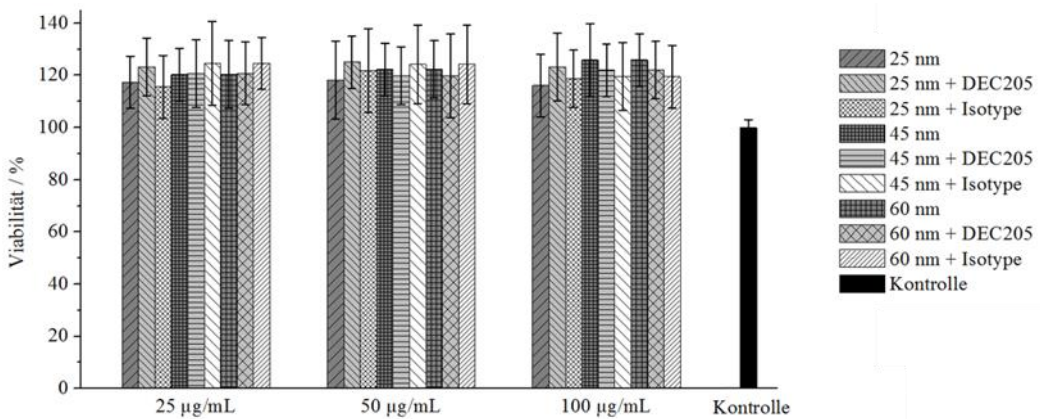


Abbildung 128: Zytotoxizitätstest von nackten, DEC205 und Kontrollantikörper (Isotype) funktionalisierten SiO<sub>2</sub>-Partikeln (25 und 45 nm, Synthese über den Stöber-Prozess).

---

### **E. 7. Silica-Coated Au@ZnO Janus Particles and Their Stability in Epithelial Cells**

Moritz Susewind, Anna-Maria Schilman, Julia Heim, Andreas Henkel, Thorben Link, Matthias Wiens, Werner E. G. Müller, Carsten Sönnichsen, Karl Fischer, Muhammad Nawaz Tahir, and Jürgen Brieger, Wolfgang Tremel\*

**To be submitted (in Revision) - DOI: 10.1039/b000000x**

Multicomponent particles have emerged in recent years as new compartmentalized colloids with two sides of different chemistry or polarity that have opened up a wide field of unique applications in medicine, biochemistry, optics, physics and chemistry. A drawback of particles containing a ZnO hemisphere is their low stability in biological environment due to the amphoteric properties of  $\text{Zn}^{2+}$ . Therefore we have synthesized monodisperse Au@ZnO Janus particles by seed-mediated nucleation and growth whose ZnO domain was coated selectively with a thin  $\text{SiO}_2$  layer as a protection from the surrounding environment that imparts stability in aqueous media while the Au domain remained untouched. The thickness of the  $\text{SiO}_2$  layer could be precisely controlled. The  $\text{SiO}_2$  coating of the oxide domain allows biomolecule conjugation (e.g. antibodies, proteins) in a single step for converting the photoluminescent and photocatalytic active Janus nanoparticles into multifunctional efficient vehicles for cell targeting. The  $\text{SiO}_2$ -coated functionalized nanoparticles were stable in buffer solutions and other aqueous systems. Biocompatibility and potential biomedical applications of the Au@ZnO@ $\text{SiO}_2$  Janus particles were assayed by a cell viability analysis by co-incubating the Au@ZnO@ $\text{SiO}_2$  Janus particles with epithelia cells and compared to those of uncoated ZnO.

#### **Introduction**

There is a plethora of procedures available for crafting the sizes, shapes, or surface chemistries of nanocrystals. Spheres, polyhedra, rods, plates, tetrapods, or dumbbells can be made with high fidelity.<sup>1</sup> These nanocrystals can be functionalized using organic ligands with functionalities imparting specific surface properties: solubility, specificity towards small molecules or larger biomolecules,<sup>2</sup> resilience to nonspecific adsorption,<sup>3</sup> electric charge,<sup>4</sup> or electrochemical activity.<sup>5</sup> A particularly interesting group of nanomaterials are asymmetric

(Janus-type) heteroparticles, compartmentalized colloids that possess two ends of different polarity and/or chemistry.

Janus particles have attracted attentions in a wide range of applications<sup>6</sup> and they are fascinating objects in the study of self-assembly,<sup>7,8</sup> in the stabilization of emulsions,<sup>9,10</sup> as dual-functionalized optical, electronic, and sensor devices.<sup>11,12</sup> Janus particles have been obtained first from dendrimers<sup>13,14</sup> and block copolymer micelles,<sup>15,16</sup> but later also from inorganic nanoparticles containing gold,<sup>17-21</sup> silver,<sup>17,18,22,23</sup> platinum,<sup>24-26</sup> alloys,<sup>27-31</sup> or 3d metals,<sup>32-35</sup> and oxide, metal and metal sulfide<sup>36-44</sup> components, or semiconductor NPs.<sup>45</sup>

The interesting features of Janus particles are attributed to their tunable asymmetric structure, which allows controlling their physicochemical properties down to the nanoscale. Catalytically or electrochemically active metal components (e.g. Au, Pt, or Ni)<sup>46,47</sup> and magnetic materials have received attention, because the noble metals can be recovered magnetically after use. In addition, wavelength-tunable photocatalytic materials with efficient charge separation capabilities have been made with heterostructures based nanocrystals with size-tunable properties.<sup>48,49</sup>

When loaded with distinct drugs or dyes, the particles have potential biomedical applications.<sup>50</sup> In addition their potential for multiplexing, multilevel targeting, and combination therapies makes them active targets of research.<sup>50,51</sup> Janus particles with adjustable composition and form may have multiple functionalities that are useful for synchronous biolabeling, separation, detection, and multimodal imaging in biomedicine.<sup>50-53</sup> A stringent requirement is a highly controlled synthesis to obtain Janus particles with well defined structural, physical, chemical and toxicological properties.

Au nanoparticles, the prototypical metal component of Janus particles, show a large polarizability in the optical range via excitation of localized surface plasmon resonances,<sup>54,55</sup> and they generate a strong optical signal. The fluorescence from the Au nanoparticles may originate from radiative recombination of sp-band electrons and d band holes, which could be enhanced by 4-6 orders of magnitude due to the surface plasmons of nanocrystals or rough metal surfaces. Previously, Au nanorods have shown strong two-photon fluorescence for cellular imaging.<sup>56-64</sup>

---

Furthermore, they are very stable and can bind molecules of interest in a controlled fashion without photobleaching, a typical drawback of common fluorescent dyes.<sup>65</sup> In addition, gold nanoparticles have promising therapeutic properties as hyperthermal agents because the local temperature around gold nanoparticles can be increased by laser illumination through the tunable surface plasmon bands in the near infrared region (NIR).<sup>66-68</sup>

Among the metal oxides, ZnO is an important transparent semiconductor which has been explored for applications such as solar cells,<sup>69-71</sup> optoelectronic devices,<sup>72</sup> or for cell labeling in biological applications<sup>73</sup> or for the promotion of reactive oxygen species generation.<sup>74,56</sup> Moreover, they have shown some promise as cholesterol biosensors, dietary modulators for hydrolase activity relevant to controlling diabetes and hyperlipaemia, as well as cell imaging. One major drawback of semiconductor particles such as ZnO is their instability in non-neutral media. As a result, ZnO nanoparticles are mildly toxic in organisms<sup>57-60</sup> which is related to dissolution of Zn<sup>2+</sup> ions. In contrast, ligand coated nanoparticles, however, have shown lower toxic effects depending on the constitution of the protection shell.<sup>21,61</sup> Therefore, the formation of a silica coating around the ZnO component may offer advantages such as chemical and physical protection from the surrounding environment, stability in aqueous media, and a platform for further modification,<sup>62,63</sup> but a continuous silica shell around the Janus particles would forfeit the surface addressability of a heteroparticle.<sup>64</sup>

Here, we present a method for the synthesis of multifunctional Au@ZnO Janus particles, where only the ZnO component was covered with a thin silica shell due to the wetting of the hydrophilic ZnO compared to the hydrophobic Au component. The established surface chemistry for silica still allowed adapting the particle properties through specific functionalization by conjugation of chromophors or biomolecules. Different from uncoated Au@ZnO or pure ZnO nanocrystals Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles were stable in human blood serum and epithelial cells. Their solubility in physiological medium, good biocompatibility and fluorescence in combination with optical activity imparted by the Au component makes them alternatives to current nanoparticle-platforms for biomedical/bioimaging applications. Intrinsically fluorescent silica coated Au@ZnO nanocrystals were water-soluble (Fig. S1, Supporting Information) and could be adopted for molecularly targeted imaging of cancer cells.

## Experimental

Zinc acetate dihydrate (99.999% trace metals basis Sigma Aldrich), gold (III) chloride hydrate (99.999% trace metals basis Sigma Aldrich), benzyl alcohol, (99%, Acros) oleylamine (90%, Acros), i-octadecene (90%, Acros), Igepal CO-520 (Sigma Aldrich), tetraethoxysilane (TEOS) (>99%, Sigma Aldrich), fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC) (Sigma Aldrich), Rhodamine B isothiocyanate (RITC) (Sigma Aldrich), ammonium hydroxide (25%, aqueous solution, Sigma Aldrich), 2-methoxy-(polyethyleneoxy)-propyltrimethoxysilane (PEG-silane, n = 6-9) (90%, ABCR), cyclohexane (Sigma Aldrich), ethanol (99.8%, Roth), chloroform (>99%, Sigma Aldrich), hexane (p.A. Fisher), imidazole (99%, (titration), crystalline, Sigma Aldrich), were used as received without further purification.

Synthesis of Au@ZnO hybrid nanocrystals. Au@ZnO hybrid nanocrystals were synthesized by mixing 0.05 mmol of gold (III) chloride hydrate (20 mg), 6 mL of benzyl alcohol, 3 mL of 1-octadecene, 3 mL oleylamine, and 0.5 mmol of zinc acetate dihydrate (109 mg, pre-annealed at 110 °C for 10 min), and the mixture was heated to 120 °C. The reaction contents were kept at 120 °C for 20 min. The solution was further heated to 180 °C and kept at this temperature for 30 min and cooled slowly to room temperature. The product was precipitated from solution by centrifugation (9000 rpm, 10 min, RT). Finally, the product was dissolved in chloroform or hexane and stored at room temperature.

Synthesis of ZnO nanocrystals. ZnO nanocrystals were synthesized by dissolving 0.5 mmol of zinc acetate dihydrate (109 mg and preheated at 110° C for 10 min) in 7 mL of benzyl alcohol and 3 mL of oleylamine. The mixture was heated slowly to 180° C and kept at this temperature for 30 min. The nanoparticles were precipitated with excess ethanol and separated by centrifugation. Finally, the product was dissolved in chloroform or hexane and stored at room temperature.

Surface functionalization of ZnO nanoparticles and Au@ZnO hybrid nanocrystals. ZnO or Au@ZnO hybrid nanocrystals (1.6 mg) were dissolved in 1 mL of CHCl<sub>3</sub> and mixed with 3 mL of imidazole solution (1 mg/mL). The solution was stirred for 5 min at room temperature under inert gas conditions. The functionalized Au@ZnO heterostructures were precipitated by centrifugation and subsequently washed twice with ethanol and finally resuspended in distilled water.



---

Silica coating of Au@ZnO particles hybrid nanocrystals. The SiO<sub>2</sub> functionalization was performed using the reverse microemulsion technique. Briefly, 200 mg of Igepal-CO-520 were dissolved in 3.5 mL cyclohexane and stirred for 10 min under Ar- atmosphere. Then roughly 1.6 mg of the Au@ZnO nanoparticles in 70 µL of n-hexane were added to the solution and stirred for further 30 min. Aqueous NH<sub>4</sub>OH (18 µl) were added to induce micelle formation. TEOS (14 µl) (and FITC) were added after 4 min and the reaction mixture proceeded under Ar- atmosphere over night.

Functionalization of Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanocrystals Further functionalization of the silica shell was achieved by addition of PEG-silane (15 µL), which led to complete precipitation of the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticles within 2 hours. The nanoparticles were collected by centrifugation and washed several times by dissolution in ethanol and centrifugation (13000 rpm, 10min, RT). The obtained particles were easily soluble in acetone, ethanol, DMF/DMSO, and various aqueous media.

Analytical characterization. The particles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), attenuated total reflection Fourier transformed infrared spectroscopy (ATR-FT-IR), UV-VIS, photoluminescence and fluorescence spectroscopy, dark field microscopy (DFM) and dynamic light scattering (DLS). TEM images were recorded using a Philips EM420 microscope with an acceleration voltage of 120 kV. Samples for TEM were prepared by dropping a dilute solution of nanoparticles in the appropriate solvent (hexane, ethanol, water) onto a carbon coated copper grid (Plano, Wetzlar; Germany). ATR-FT-IR-spectra were measured on a Thermo Scientific Nicolet iS10 FT ATR-IR spectrometer. UV-VIS-spectra were collected by a Varian Cary 5000 UV-VIS/NIR-spectrometer, the photoluminescence spectra were recorded on a Horiba Jobin Yvon-SPEX (Fluoro Max-2) fluorescence spectrometer and the fluorescence analysis was performed with an Olympus AHB3 light microscope, together with an AH3-RFC-reflected light fluorescence attachment at the emission wavelength of 540 nm. DFM measurements were performed on a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscope with a PI542 XY-piezo stage. Furthermore, an Inspector V10E transmissive imaging spectrograph with an Andor Luca R EM-CCD was added. The true colour images were taken with a Canon EOS 5D Mark II (IR-filter removed). The

automated data acquisition for the 33 single extinction spectra was performed with a MATLAB based control software.

Dynamic light scattering (DLS). DLS measurements were performed using a Uniphase He/Ne Laser (=632.8 nm, 22 mW), a ALV-SP125 Goniometer, a ALV/High QE APD-Avalanche photo-diode with fiber optical detection, a ALV 5000/E/PCi-correlator and a Lauda RC-6 thermostat unit. Angular dependent measurements were carried out in the range  $30^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$ .

For data evaluation experimental intensity correlation functions were transformed into amplitude correlation functions applying the Siegert-relation extended to include negative values after baseline subtraction from  $g_1(t) = \text{SIGN}(G_2(t)) \cdot \text{SQRT}(\text{ABS}((G_2(t)-A)/A))$ .

$g_1(t)$  was obtained by fitting a biexponential function  $g_1(t) = a \cdot \exp(-t/b) + c \cdot \exp(-t/d)$  which accounts for the sample polydispersity. Average apparent diffusion coefficients  $D_{\text{app}}$  were determined from the equation  $q^2 \cdot D_{\text{app}} = (a \cdot b^{-1} + c \cdot d^{-1}) / (a+c)$ .  $D_{\text{app}}(q=0)$  was determined by plotting  $D_{\text{app}}(q)$  vs.  $q^2$  and extrapolation to  $q \rightarrow 0$ . Hydrodynamic radii were extracted from the Stokes-Einstein equation. Sample concentrations for the DLS measurements were in the range 0.2 g/L. All samples were filtered into dust free cylindrical scattering cells (Hellma, Suprasil, 2 cm diameter) using syringe filters (Millipore LCR 450 nm for aqueous solutions).

Cell culture and cytotoxicity-assay. An adenocarcinoma cell line A549 (ATCC, Manassas, VA, USA) was used as a model of respiratory epithelia. Cells were cultured in DMEM/Ham's F12 (Sigma Aldrich), supplemented with 5% FCS (Sigma Aldrich) and antibiotic solution (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin; Sigma Aldrich) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. For analysis of the cell viability after treatment with the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticles, 15.000 cells/well were seeded in a 96 well plate and cultivated overnight for adherence. Next day, the cells were treated with the Janus particles in three different concentrations (25, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. After incubation, 100  $\mu\text{L}$  70% ice cold EtOH was added to the cells of the death control for 10min. The media of all wells were replaced by 200  $\mu\text{L}$  FCS-medium with 10% Alamar Blue (Biozol Diagnostica, Eching, Germany). Subsequently the samples were incubated for 3h at 37 °C. The results were obtained using a (Fluoroskan Ascent Microplate reader, Thermo Fisher Scientific GmbH, Rockford, USA) plate reader (ex: 540 nm, em: 600 nm) and normalized to untreated control. After measuring the viability of the cells, the results had to be compared to the real cell number per well. For this, the cells were washed 3

times with PBS and a 0.2% crystal purple solution (50  $\mu\text{L}$ /well) was added and incubated for 10 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After incubation the cells were washed again and were treated with 40  $\mu\text{L}$  of 10% acetic acid for lysis. The real cell amount was measured on plate reader (Mikrotiterplattenphotometer Multiskan Ascent<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific GmbH, Rockford, USA) at 540 nm.

Immunofluorescence staining. The cells were fixed (4% paraformaldehyde, methanol free) and washed 3 times with PBS and nonspecific interactions were blocked for 20 min in 1% BSA/PBS. Afterwards, cells were exposed to phalloidin (5  $\mu\text{L}$ /200  $\mu\text{L}$  v/v, Cell Signaling, Danvers, USA) for 20 min. The coverslips were mounted on slides using DAKO fluorescent mounting medium (Dako, Inc., Carpinteria, CA, USA). All slides were examined using an inverted microscope (Nikon ECLIPSE TE2000-U).

### Results and Discussion

Au@ZnO Janus particles were prepared following a recently reported method.<sup>75</sup> The synthetic route for the preparation of the nanoparticles and its encapsulation with the silica shell is illustrated in Fig. 1. In the first step Au nanoparticle intermediates were prepared *in situ* by reduction of  $[\text{AuCl}_4]^-$  in the presence of oleylamine at 120  $^{\circ}\text{C}$ . ZnO was nucleated heterogeneously on the gold seeds and grown by thermal decomposition of zinc acetate at  $\sim 180^{\circ}\text{C}$ . Match-stick-type Au@ZnO hybrid nanocrystals were prepared in the nonpolar solvent 1-octadecane.

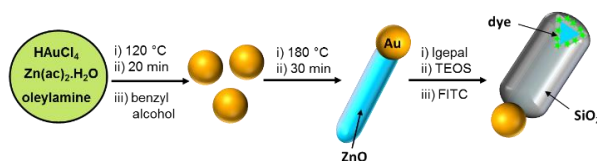


Fig 1. Seed-mediated growth of Au@ZnO Janus particles and subsequent silica encapsulation of the ZnO domain.

The silica encapsulation of Janus particles via reverse microemulsion technique has been employed previously.<sup>21,63</sup> The particular challenge for Au@ZnO is the instability of the ZnO component in acidic or basic media due to the amphoteric character of Zn. It exerts a strong influence on the Au/ZnO interface as well, i.e. in the silica-encapsulating step a well-defined and visible silica shell must be formed without changing the Janus particle morphology.

The thickness of the silica shell could be controlled by adjusting the pH value. The hydrolysis of TEOS is increased by catalytic amounts of acid or base. We deposited silica by basic hydrolysis of TEOS in dilute  $\text{NH}_3$  solution. By varying the pH of the aqueous phase the thickness of the silica shell could be precisely controlled in the nanometer range: for pH = 10.3 the shell thickness was 1-2 nm, at pH = 10.9 it increased to 3-4 nm (Fig. 2 (a,b), (c,d)) as determined by TEM.

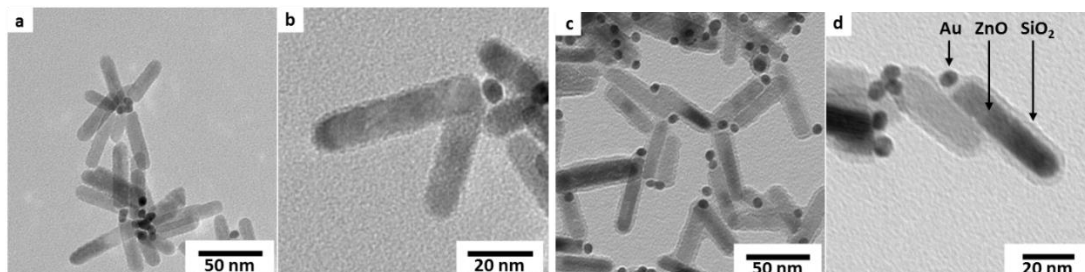


Fig. 2. (a) Overview TEM bright field image of  $\text{Au@ZnO@SiO}_2$  nanoparticles showing aggregation via the hydrophobic Au tips, (b) corresponding TEM micrograph of single encapsulated heterodimers with 2 nm silica shell thickness and (c,d) particle aggregation and morphology of  $\text{Au@ZnO@SiO}_2$  with 4 nm shell thickness.

The Au domains were not wetted due to their hydrophobicity, and the silica shell forms exclusively on the metal oxide domains, which leaves the Au domains available for further functionalization, e.g. with thiols. The TEM data for individual particles are corroborated for bulk samples by quantitative evaluation of the X-ray diffraction data of  $\text{Au@ZnO}$  hybrid nanocrystals (Rietveld refinements) (Fig. S2, Supporting Information). Only single nanoparticles were encapsulated in a silica shell, multiple encapsulations were not observed. Fig. 2 shows  $\text{Au@MnO@SiO}_2$  nanoparticles after the functionalization was complete. The nanoparticles appear uniform and well separated, even though, they are functionalized orthogonally.

The formation of the silica shell was monitored by FT-IR spectroscopy. Fig. 3 displays FT-IR-spectra of  $\text{Au@ZnO}$  nanoparticles before and after silica encapsulation. The spectrum of oleylamine-capped  $\text{Au@ZnO}$  nanoparticles (black line) displays characteristic vibrational bands at  $2926$  and  $2854\text{ cm}^{-1}$ , which are assigned the symmetric and asymmetric stretching modes of the  $\text{CH}_2$ - and  $\text{CH}_3$ -groups.<sup>76</sup> In the IR spectrum of the  $\text{Au@ZnO@SiO}_2$  particles, a broad and strong band system in the region between  $1200$  and  $1000\text{ cm}^{-1}$  appeared, which can

be assigned to the O-Si-O stretching modes. The stretching vibrations due to CH<sub>2</sub>- and CH<sub>3</sub>-groups remained, although less pronounced, due to the conjugation of PEG-chains to the surface of the silica shell as well as the ligands of the Au domains.<sup>63</sup>

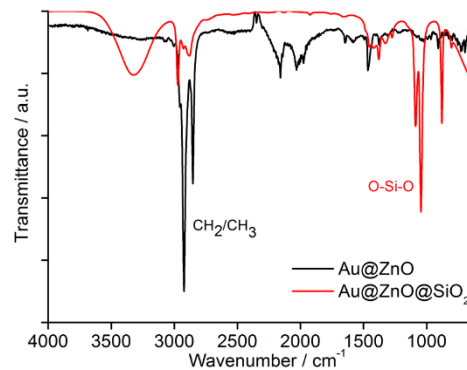


Fig. 3. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of Au@ZnO (black line) and Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> (red line) nanoparticles. Strong O-Si-O stretching modes emerge with silica encapsulation of the nanoparticles.

The UV/Vis absorption spectra of Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles in Fig. 4 (a) show two absorption maxima: the ZnO semiconductor is excited at 355 nm,<sup>77</sup> while the Au plasmon band appears at 494 nm. Au nanoparticles in the 5-12 nm size range show a characteristic plasmon resonance at  $\approx$  512-520 nm, where the exact maximum depends on the particle shape and surface coating.<sup>21,54</sup> There is an increase of the ZnO absorbance intensity of Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> compared to the spectrum of uncoated Au@ZnO (Fig. 4a), additionally photoluminescence spectroscopy was performed on that sample. Excitation of the ZnO domain at 325 nm wavelength showed a much stronger intensity of the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> than of the Au@ZnO nanoparticles (Fig. 4b). This is in line with an earlier report on ZnO nanoparticles incorporated in a silica matrix.<sup>78</sup>

The exciton band of pure ZnO nanoparticles appears at 360 nm, and is slightly red shifted for 5 nm. The quasi-epitaxial growth of the ZnO domains on the gold seeds changes the local dielectric function of their surrounding medium, and, therefore, the position of the maximum of the plasmon absorption band. Fig. 4a shows a blue shift of the absorption maximum of the gold components by about 25 nm compared to the plasmon band of pure Au nanoparticles ( $\approx$  512-520 nm depending on parameters like particle morphology, size, solvent according to Mie's theory).<sup>79,80</sup> The shift may be estimated quantitatively using the optical constants for Au

nanoparticles and is related by the conjugation to semiconducting ZnO, the dependence of the wavelength on the density of electrons, effective electron mass, as well as shape and size of charge distribution.<sup>81</sup>

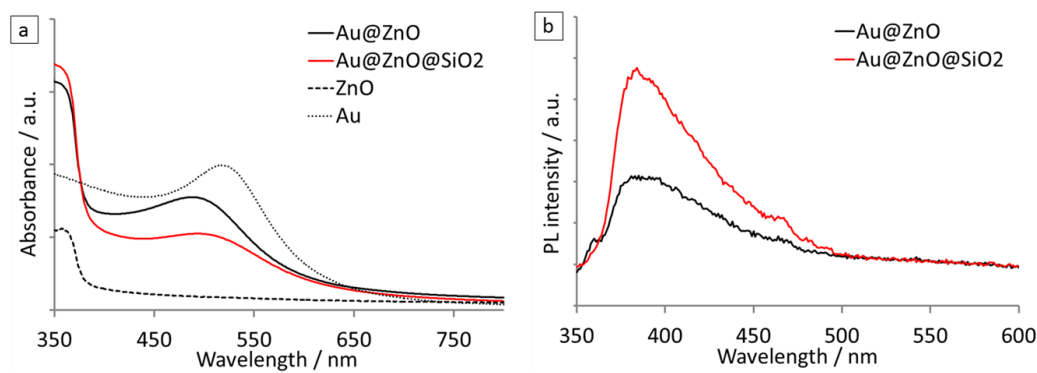


Fig. 4. (a) UV-vis spectra of Au@ZnO (solid, black), Au (dotted, grey) and ZnO (dotted, black) and Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> (solid, red) nanoparticles. The silica layer thickness of the encapsulated nanoparticles is 1-2 nm. (b) Photoluminescence spectra of Au@ZnO (solid, black) and silica encapsulated Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> (solid, red) nanoparticles after excitation with light of 325 nm wavelength.

The Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticles showed a bright fluorescence under UV light suggesting an application as fluorescent probe. The green emission of ZnO is believed to originate from defects, such as oxygen vacancies in a form of a singly ionized  $V_{O}^{+}$  centers or a doubly ionized  $V_{O}^{++}$  centers, zinc vacancies or interstices, are possible causes of the green emissions in ZnO. The silica shell inhibits the diffusion of reactive species from the surface to the ZnO core, although the protection may be incomplete due to the presence of micropores in the shell.

Further spectroscopic investigation of the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> particles by dark field microscopy (DFM) revealed an aggregation in polar solvents. More than thirty single extinction spectra of these aggregates were recorded according to the literature;<sup>82</sup> all of them showed a bimodal form with very similar resonance positions, as displayed for four representative spectra in Fig. 5a. All spectra were recorded by DFM from the sample in Fig. 5 b. The TEM micrograph also indicated similar aggregation of the nanoparticles which stick together via their Au tips in order to avoid hydrophilic/hydrophobic interactions (Fig. 5c). The amplitude of the extinction spectra consists of two optical modes, which have been reported for smaller aggregates of noble metal nanoparticles,<sup>83</sup> generating two plasmon resonances. The individual spectra were taken from aggregates attached to a glass surface from original solution without drying, so

they reflect the state in solution. According to the spectra for silver nanoparticle trimers<sup>83</sup> and TEM micrograph analysis (Fig. 5c), the particles might aggregate in the form of fully symmetric trimers.

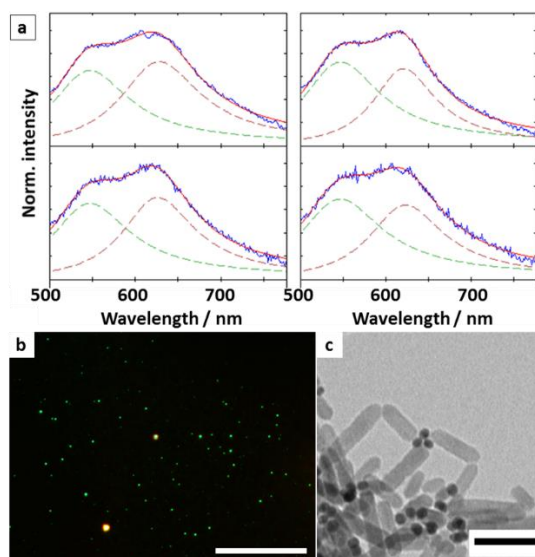


Fig. 5. (a) Darkfield microscopy extinction spectra (extinction spectrum (blue, solid), Lorentzian fit-functions of single modes (dashed), superposition of Lorentzian fits (red, solid)), taken from the image (b, scale: 20  $\mu\text{m}$ ) indicate aggregation of the Janus particles via their gold tips as shown in (c). Scale: 50 nm.

A better insight into the aggregation behaviour of the particles in solution was obtained from dynamic light scattering (DLS) measurements of aqueous nanoparticle solutions ( $c = 0.2 \text{ g/L}$ ) at five different scattering angles in the range of  $30^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$  (Fig. 6). Fig. 6a displays nearly monomodal decay functions, indicating a relative low polydispersity. In a regime, where for monodisperse particles the product of the scattering vector  $q$  and the rod length  $L$  is  $\leq 5$ , one should expect a monoexponential decay of the amplitude correlation function  $g_1(t)$ . The average rod length of 60 nm was determined by TEM; it results in a  $qL$  regime of  $qL \leq 1.5$ . The expected diffusion coefficient  $D$  can be calculated by an expression given by Tirado and Garcia de la Torre,<sup>84</sup> whereby

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta L} (\ln p + v) \quad (1)$$

with

$$v = 0.312 + \frac{0.565}{p} - \frac{0.1}{p^2} \quad (2)$$

Here,  $p$  is the aspect ratio ( $L/d$ ) of the nanorods with the rod length  $L$  (60 nm) and the diameter  $d$  (10 nm). The calculation of the hydrodynamic radius  $R_H$  from the diffusion coefficient  $D_s$  is given by the Stokes-Einstein equation

$$D_s = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (3)$$

which yields a calculated hydrodynamic radius

$$R_H = \frac{L}{2(\ln p + \nu)} \quad (4)$$

for anisotropic nanoparticles. For the aspect ratio  $p = 6$  and the parameter  $\nu = 0.4$ , the expected hydrodynamic radius is  $R_H = 14$  nm. From the  $z$ -average diffusion coefficient  $\langle D_s \rangle_z$  for  $q = 0$  (Fig. 6b), the hydrodynamic radius was calculated by the Stokes-Einstein equation, yielding  $R_H = 74$  nm. The disparity between the theoretical and experimental value suggests also some aggregation behaviour in solution. Micellar arrangement seems to be very homogenous according to the nearly monoexponential decay functions in Fig. 6. The really low polydispersity of the samples is further confirmed by an only slight angular dependency of the apparent diffusion coefficient, which is only  $\sim 5\%$  over the whole angular range (Fig. 6b).

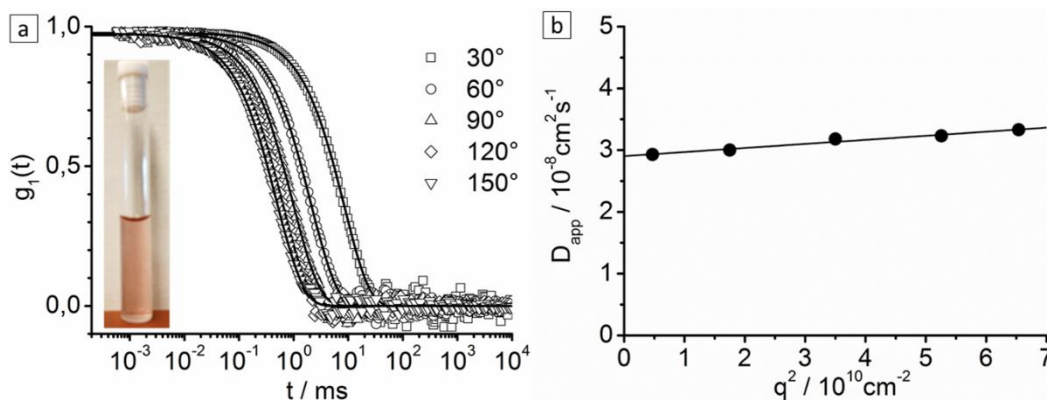


Fig. 6. (a) Biexponential fits (solid line) of the amplitude correlation functions at five different scattering angles showing nearly monomodal decay (Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> in Millipore water, 0.2 g/L, T = 293 K, viscosity  $\eta$ : 1.005 cP) (b) Apparent diffusion coefficient as a function of the squared scattering vector  $q^2$  in the range of  $30^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$ .

This low polydispersity gives evidence for the existence of well defined aggregates, which may be considered to be “micellar like”. Since hydrodynamic radii were nearly the same for measurements with and without low salt concentrations (50 mM TBS; 5 mM NaCl), the aggregation seems to be independent of Coulomb interactions.



These results follow the explanation of hydrophobic Au-tip/Au-tip arrangements to avoid hydrophobic/hydrophilic interactions. In order to further prove the free addressability of the Au-tip, an orthogonal functionalization was performed on the Au domain via the Au specific isothiocyanate group of the dye Rhodamine B isothiocyanate (RITC). The silica shell was tagged with FITC dye during silica formation; RITC was bound on the Au tip afterwards. Fig. 7 displays the UV-vis spectrum of the orthogonal dye tagged nanoparticles. The absorbance maxima of FITC (492 nm) and RITC (550 nm) clearly emerge in the absorbance spectrum of the functionalized nanoparticles.

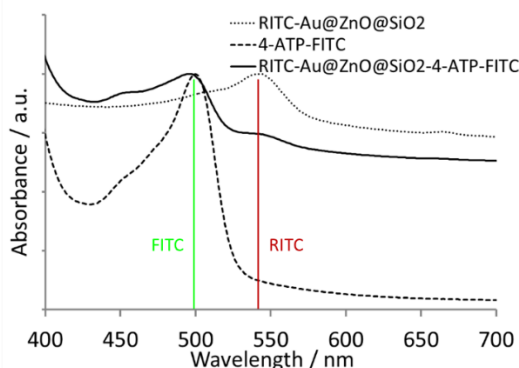


Fig. 7. UV-vis spectra of orthogonal functionalized Janus nanoparticles with the dyes FITC (incorporated into the silica shell) and RITC (bound to the Au domain) (solid) and spectra of the single components (dashed).

The functionalized particles with incorporated FITC dye were analyzed by fluorescence microscopy to visualize the silica coated ZnO domains (Fig. 8). The image shows aggregates of nanoparticles upon excitation with blue light ( $\lambda = 490$  nm). Reference samples without dye showed no fluorescence.

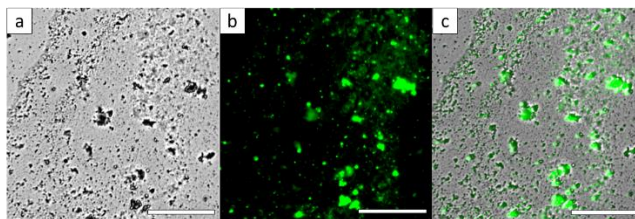


Fig. 8. (a) Light microscope image of Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates, (b) corresponding confocal laser fluorescence scanning microscopy image with embedded FITC dye excited with 490 nm, (c) overlay image of (a) and (b). Scale: 50  $\mu$ m.

Biocompatibility of the particles. A potential biomedical use of silica coated Au@ZnO Janus particles is the targeted drug delivery using immunostimulatory oligonucleotides.<sup>50,63,85-87</sup> Therefore, the cytotoxic behavior of the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles was studied for human adenocarcinoma cells (A549).

Biocompatibility and potential biomedical applications of the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles were assayed by a cell viability analysis by co-incubating the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles with the adenocarcinoma A549 cell line. A cell viability assay (for 24 hours, 37°C) revealed the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus particles to be non-cytotoxic, i.e. that in concentrations of 25, 50, and 100 µg/mL the percentage of cell survival was in all cases ≥ 90%) (Fig. 9). Contrary, ZnO nanoparticles without a silica protection shell revealed a much lower cell viability of ~ 20% (100 µg/mL). The drastically reduced cell toxicity of the encapsulated Janus nanoparticles is supposed to originate from the prevented dissolution of Zn ions which enables the heterodimers to act as stable, non-toxic molecules in cell targeting. To prove the cell uptake, immunofluorescence staining was successfully performed with FITC-labeled Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> in Alexa Fluor 555 Phalloidin-labeled adenocarcinoma cells.

Immunofluorescence staining. Cell imaging was carried out by confocal laser fluorescence scanning microscopy. For immunofluorescence staining, the cells were cultivated and incubated overnight in order to achieve full coverage on the coverslips. The next day the cells were co-incubated for 24h with FITC-labeled Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> with a final concentration of 100 µg/mL. The confocal laser fluorescence scanning microscopy image in Fig.10 displays a significant uptake of the green fluorescent Janus nanoparticles in the Alexa-labeled adenocarcinoma cells (red).

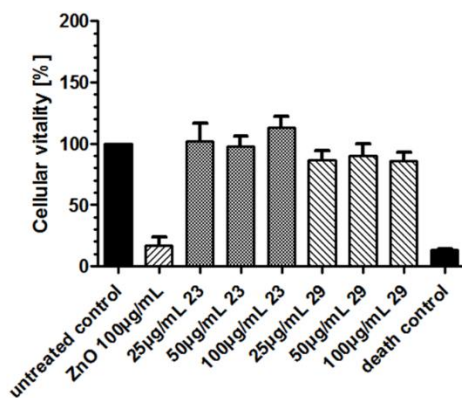


Fig. 9. Vitality assay of A549 cells incubated with non-toxic Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticles. Contrary, pure ZnO nanoparticles (100 µg/mL) behave mildly cell toxic and show little cell viability (~ 20%).

### Conclusions

In summary, we demonstrated the synthesis of well-defined anisotropic Janus nanoparticles consisting of a Au noble metal and a ZnO domain acting as non-cytotoxic cell targeting molecules in the UV and visible wavelength regime. The ZnO part could selectively be encapsulated with a thin silica shell in order to stabilize the nanoparticles in aqueous systems and to prevent the particles from ion leaching. Contrary to pure ZnO nanoparticles, which are mildly cell toxic and show only little cell survival percentages of ~20% in cell viability assays, the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> Janus nanoparticles are non-cytotoxic with cell viability percentages of  $\geq 90\%$  (100 µg/mL in each case). The thickness of the shell could be adjusted via the pH-value of the micelle inducing aqueous ammonia solution during the silica forming step, leaving the Au domain untouched for further functionalization with e.g. thiol bearing proteins. This enables the nanoparticles to serve as biocompatible, multifunctional, non-cytotoxic heterodimers, whereupon each part can be addressed selectively. Besides their biocompatibility the Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> nanoparticles also have great potential as fluorophores in the field of cell targeting through the Au plasmon band, the enhanced photoluminescence intensity of the ZnO domain and the possibility to incorporate fluorescence dyes into the silica shell. Confocal laser fluorescence scanning microscopy images of the uptake of FITC-labeled nanoparticles in adenocarcinoma cells in Fig. 10 proved their potential to use them as suitable cell targeting molecules.

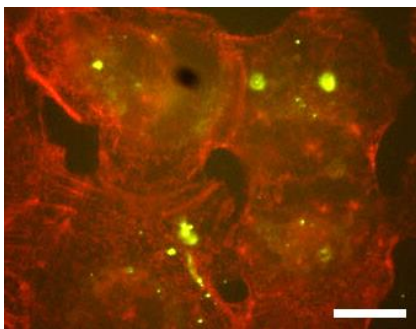


Fig. 10. Confocal laser fluorescence scanning microscopy image of the uptake of FITC-labeled Au@ZnO@SiO<sub>2</sub> (green) nanoparticles in adenocarcinoma cells (red, Alexa Fluor 555 Phalloidin). Scale: 20 μm.

## Acknowledgements

This research was supported by the Deutsche Forschungsgesellschaft through the SFB 1066. We are grateful to Professor Manfred Schmidt for technical support regarding DLS measurements. The facilities of the Electron Microscopy Center in Mainz (EZMZ) were supported by the State Excellence Cluster COMATT and SFB 625. Microscopy work of the LSM-Core Facility at the University Clinic in Mainz was supported by the Research Center for Immunology (FZI).

## Notes and references

<sup>a</sup>Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Duesbergweg 10-14, D-55099 Mainz, Germany. Fax: +49 6131 39-25605; Tel: +49 6131 39-25135; E-mail: tremel@uni-mainz.de, tahir@uni-mainz.de <sup>b</sup>Hals-, Nasen- Ohrenklinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, D-55131 Mainz, Germany. <sup>c</sup>Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Welderweg 11, 55099 Mainz, Germany. <sup>d</sup>Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, Johannes Gutenberg-Universität, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany  
\*Corresponding Author: E-Mail: tremel@uni-mainz.de

- 1 L. Carbone and P. D. Cozzoli, *Nano Today*, 2010, 5, 449-493.
- 2 E. Katz and I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 6042-6108.
- 3 M. Zheng, F. Davidson, and X. Huang, *J. Amer. Chem. Soc.* 2003, 125, 7790-7791.
- 4 A. M. Kalsin, M. Fialkowski, M. Paszewski, S. K. Smoukov, K. J. M. Bishop, and B. A. Grzybowski, *Science* 2006, 312, 420-424.
- 5 T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1192-1199.
- 6 D. Wang and Y. Li, *Adv. Mater.* 2011, 23, 1044-1060.
- 7 S. Mann, *Nat. Mater.* 2009, 8, 781-792.
- 8 A. Walther, A. H. E. Müller, *Chem. Rev.* 2013, **113**, 5194–5261.
- 9 P. Dommersnes, Z. Rozynek, A. Mikkelsen, R. Castberg, K. Kjerstad, K. I. Hersvik, and J. O. Fossum, *Nat. Commun.* 2013, 4, 2066, DOI: 10.1038/ncomms3066
- 10 D. Hirsemann, R. A. De Souza, B. Diar-Bakerly, B. Biersack, D. N. Mueller, M. Martin, R. Schobert, and J. Brey, *Angew. Chem.* 2012, 124, 1376-1380; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 1348–1352.
- 11 A. Perro, S. Reculosa, E. Bourgeat-Lami, and E. Duguet, *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 3745-3760.
- 12 A. G. Vanakaras, *Langmuir* 2006, 22, 88-93.
- 13 J. Ropponen, S. Nummelin, and K. Rissanen, *Org. Lett.* 2004, 6, 2495- 2497.
- 14 V. Percec, M. R. Imam, T. K. Bera, V. S. K. Balagurusamy, M. Peterca, and P. A. Heiney, *Angew. Chem.* 2005, **117**, 4817–4823; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4739-4745.
- 15 J. Wang, G. Liu, G. Rivas, *Anal. Chem.* 2003, 75, 4667-4671.

- 16 R. Erhardt, M. F. Zhang, A. Böker, H. Zettl, C. Abetz, P. Frederik, G. Krausch, V. Abetz, and A. H. E. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3260-3267.
- 17 H. Yu, M. Chen, P. M. Rice, S. X. Wang, R. White, and S. Sun, *Nano Lett.* 2005, 5, 379-382.
- 18 C. Xu, J. Xie, D. Ho, C. Wang, N. Kohler, E. Walsh, J. Morgan, Y. Chin, and S. Sun, *Angew. Chem.* 2008, **120**, 179–182; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 173-176.
- 19 C. Xu, B. Wang, and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 4216-4217.
- 20 T. D. Schladt, M. I. Shukoor, M. N. Tahir, F. Natalio, K. Schneider, I. Ament, J. Becker, F. Jochum, S. Weber, P. Theato, L. M. Schreiber, C. Sönnichsen, H.-C.; Schröder, W. E. G. Müller, and W. Tremel, *Angew. Chem.* 2010, 122, 4068-4072; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3976-3980.
- 21 I. Schick, S. Lorenz, D. Gehrig, A.-M. Schilman, H. Bauer, M. Panthöfer, K. Fischer, M. Schmidt, D. Strand, F. Laquai, and W. Tremel, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 2473-2483.
- 22 C. Pacholski, A. Kornowski, and H. Weller, H., *Angew. Chem.* 2004, 116, 4878 – 4881; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4774 -4777.
- 23 F. R. Fan, Y. Ding, D.-Y. Liu, Z. Q. Tian, and Z. L. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12036-12037.
- 24 H. Gu, Z. Yang, J. Gao, C. Chang, and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 34–35.
- 25 S. H. Choi, H. B. Na, Y. I. Park, A. Kwangjin; S. G. Kwon, Y. Jang, M.-H. Park, J. Moon, J. S. Son, C. I. Song, M. W. Moon, and T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 15573–15580.
- 26 H. Hong, L. Hu, M. Li, X. Sun, X. Lu, X. Cao, J. Lu, and H. Gu, *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 8726-8730.
- 27 A. Figuerola, A. Fiore, R. Di Corato, A. Falqui, C. Gianni, E. Micotti, A. Lascialfari, M. Corti, R. Cingolani, T. Pellegrino, P. D. Cozzoli, and L. Manna, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 1477-1487.
- 28 T. D. Schladt, T. Graf, O. Köhler, H. Bauer, K. Schneider, C. Herold, J. Mertins, and W. Tremel, *Chem. Mater.* 2012, 24, 525-535.
- 29 M. Casavola, V. Grillo, E. Carlino, F. Gozzo, E. F. Pinel, M. A. Garcia, L. Manna, R. Cingolani, and P. D. Cozzoli, *Nano Lett.* 2007, 7, 1386-1395.
- 30 M. R. Buck, J. F. Bondi, and R. E. Schaak, *Nat. Chem.* 2012, 4, 37-44.
- 31 M. J. Bradley, A. J. Biacchi, and R. E. Schaak, *Chem. Mater.* 2013, **25**, 1886–1892.
- 32 B. Nakhjavan, M. N. Tahir, H. Gao, T. D. Schladt, K. Schneider, F. Natalio, I. Ament, R. Branscheid, S. Weber, H.-C. Schröder, W. E. G. Müller, U. Kolb, C. Sönnichsen, L.M. Schreiber, and W. Tremel, *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 8605-8611.
- 33 B. Nakhjavan, M. N. Tahir, M. Panthöfer, H. Gao, T. Gasi, V. Ksenofontov, R. Branscheid, S. Weber, U. Kolb, L. M. Schreiber, and W. Tremel, *Chem. Commun.* 2011, 47, 8898-8900.
- 34 B. Nakhjavan, M.N. Tahir, F. Natalio, M. Panthöfer, H. Gao, M. Dietzsch, R. Andre, T. Gasi, V. Ksenofontov, R. Branscheid, U. Kolb, and W. Tremel, *Nanoscale* 2012, 4, 4571-4577.
- 35 T. Mokari, E. Rothenberg, I. Popov, R. Costi, and U. Banin, *Science* 2004, 304, 1787-1790.
- 36 T. Mokari, C. G. Sztrum, A. Salant, E. Rabani, and U. Banin, *Nat. Mater.* 2005, 4, 855-863.
- 37 A. E. Saunders, I. Popov, and U. Banin, *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 25421-25429.
- 38 G. Menagen, D. Mocatta, I. Popov, D. Dorfs, and U. Banin, *Chem. Mater.* 2008, 20, 6900-6902.
- 39 W. Shi, H. Zeng, Y. Sahoo, T. Y. Ohulchanskyy, Y. Ding, Z. L. Wang, M. Swihart, and P. N. Prasad, *Nano Lett.* 2006, 6, 875-881.
- 40 J. Yang, E. I. Elim, Q. Zhang, J. Y. Lee, and W. Ji, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11921-11926.
- 41 J. Yang, L. Levina, E. H. Sargent, and S. O. Kelley, *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 4025-4028.
- 42 D. V. Talapin, H. Yu, E. V. Shevchenko, A. Lobo, and C. B. Murray, *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 14049-14054.
- 43 J.-S. Lee, E. V. Shevchenko, and D. V. Talapin, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 9673-9675.
- 44 J. Yang and J. Y. Ying, *Chem. Commun.* 2009, 3187-3189.
- 45 C. G. Read, A. J. Biacchi, and R. E. Schaak, *Chem. Mater.* 2013, **25**, 4304–4311.
- 46 W. Teunissen, A. Bol, and J. W. Geus, *Catal. Today*, 1999, 48, 329-336.
- 47 S. Shylesh, V. Schünemann, and W. R. Thiel, *Angew. Chem.* 2010, **122**, 2913-2917; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3428-3459.
- 48 P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 2834-2860.
- 49 R. Costi, A. E. Saunders, and U. Banin, *Angew. Chem.* 2010, 122, *Angew. Chem.* 2010., **122**, 4996-5016; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 4878-4897.
- 50 T. D. Schladt, K. Schneider, H. Schild, and W. Tremel, *Dalton Trans.* 2011, **40**, 6315-6343.

- 51 L. Carbone and P. D. Cozzoli, *Nano Today* 2010, 5, 449-493.
- 52 D. Yoon, J. H. Lee, T.-H.; Shin, and J. Cheon, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 863-874.
- 53 N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2971-3010.
- 54 J. Perez-Juste, L. M. Liz-Marzan, and P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.* 2005, 249, 1870-1901.
- 55 M. Hu, J. Chen, Z. Y. Li, L. Au, G. V. Hartland, X. Li, M. Marquez, and Y. Xia, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 1084-1094.
- 56 H. Yin and P.S. Casey, *Langmuir* 2010, 26, 15399-15408.
- 57 M. Mortimer, K. Kasemets and A. Kahrua, *Toxicology*, 2010, 269, 182-189.
- 58 M. Heinlaan, A. Ivask, H. C. Dubourguier and A. Kahru, *Chemosphere*, 2008, 71, 1308-1316.
- 59 H. H. Wang, R. L. Wick and B. S. Xing, *Environ. Pollut.*, 2009, 157, 1171-1177.
- 60 V. Aruoja, H. C. Dubourguier and A. Kahru, *Sci. Total Environ.*, 2009, 407, 1461-1468.
- 61 H. J. Zhang, H. M. Xiong, Q.-G. Ren, Y.-Y. Xia, J.-L. Kong, *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 13159-13165.
- 62 Y. K. Peng, C.-W. Lai, C.-L.; Liu, H.-C. Chen, Y.-H. Hsiao, W.-L- Liu, K.-C. Tang, Y. Chi, J.-K. Hsiao, K.E. Lim, H.-E. Liao, J.-J. Shyue, and P.-T. Chou *ACS Nano* 2011, 5, 4177-4187.
- 63 T. D. Schladt, K. Koll, S. Prüfer, H. Bauer, F. Natalio, O. Dumele, R. Raidoo, S. Weber, U. Wolfrum, L.-M. Schreiber, M. P. Radsak, H. Schild, and W. Tremel, *J. Mater. Chem.* 2011, 22, 9253-9262.
- 64 G. A. Sotirou, A. M. Hirt, F. Krumeich, and S. E. Pratsinis, *Chem. Mater.* 2011, 23, 1985-1992.
- 65 D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit, *Science* 2002, 297, 1160-1163.
- 66 X. Huang, I. H.; El-Sayed, W. Qian, and M. A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2115-2120.
- 67 R. S. Norman, J. W. Stone, C. J. Murphy, and T. L. Sabo-Attwood, *Nano Lett.* 2008, 8, 302-306.
- 68 E. B. Dickerson, E. C. Dreaden, X. Huang, I.-H. El-Sayed, H.; Chu, S. Pushpanketh, J. F. McDonald, and M. A. El-Sayed, *Cancer Lett.* 2008, 269, 57-66.
- 69 Q. Zhang, T. P. Chou, B. Russo, S. A. Jenekhe, and G. Cao, *Angew. Chem.* 2008, **120**, 2939-2949; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 2402-2406.
- 70 N. Memarian, I. Concina, A. Braga, S. M. Rozati, A. Vomiero, and G. Sberveglieri, *Angew. Chem.* 2011, 123, 12529-12533; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 12321-12325.
- 71 A. Kim, Y. Won, K. Woo, C.- H. Kim, and J. Moon, *ACS Nano* 2013, **7**, 1081-1091.
- 72 G. G. Huang, C. T. Wang, H. T. Tang, Y. S. Huang, and J. Yang, *Anal. Chem.* 2006, 78, 2397-2404.
- 73 X. Tang, E. S. G. Tang, L. Li, J. Ding, and J. Xue, *Chem. Mater.* **2010**, **22**, 3383-3388.
- 74 G. Applerot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkas, Y. Nitzan, R. Lubart, and A. Gedanken, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 842-852.
- 75 M. N. Tahir, F. Natalio, M. A. Cambaz, M. Panthöfer, R. Branscheid, U. Kolb, and W. Tremel, *Nanoscale* 2013, **5**, 9944-9949.
- 76 T. D. Schladt, T. Graf, and W. Tremel, *Chem. Mater.* 2009, 21, 3183-3190.
- 77 P. Li, Z. Wei, T. Wu, Q. Peng, and Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 5660-5663.
- 78 Z. Fu, B. Yang, L. Li, W. Dong, C. Jia, and W. Wu, *J. Phys. Condens. Matter* 2003, 15, 2867-2873.
- 79 Mie, G. *Ann. Phys.* 1908, 330, 377-445.
- 80 M.-C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev* 2004, 104, 293-346.
- 81 K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 668-677
- 82 C. Rosman, J. Prasad, A. Neiser, J. Edgar, and Carsten Sönnichsen, *Nano Lett.* 2013, 13, 3243-324783
- 84 D. W. Brandl, N. A. Mirin, P. Nordlander, *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 12302-12310
- 84 M. M. Tirado and J. Garcia de la Torre, *J. Chem. Phys.* 2003, **119**, 9914-9920.
- 85 M. I. Shukoor, F. Natalio, P. Gupta, M. Wiens, M. Tarantola, M. Barz, S. Weber, M. Terekhov, H.-C. Schröder, W. E. G. Müller, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, L.-M. Schreiber, and W. Tremel, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 9, 3717-3725.
- 86 M. I. Shukoor, F. Natalio, N. Glube, M. N. Tahir, H. A. Therese, V. Ksenofontov, N. Metz, P. Theato, P. Langguth, J.-P. Boissel, H.-C. Schröder, W. E. G. Müller, and Tremel, *Angew. Chem.* 2008, 120, 4826-4830; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 4748-4752.
- 87 M. I. Shukoor, F. Natalio, T. D. Schladt, K. Koll, M. N. Tahir, M. Barz, S. Weber, C. Brochhausen, R. Zentel, M. Wiens, L.-M. Schreiber, J. Brieger, W. E. G. Müller, and W. Tremel, *J. Mater. Chem.* 2011, 22, 8826-8834.

**E. 8. Magnetic behavior of MnO and heterodimer FePt@MnO nanoparticles**

X. Sun, A. Klapper, Y. Su, K. Nemkovski, A. Wildes, H. Bauer, O. Köhler, A. Schilman,  
W. Tremel, O. Petracic, T. Brückel

**To be submitted**

**Abstract**

We have investigated the magnetic spin structure of antiferromagnetic (AF) MnO nanoparticles (NPs) with different sizes (5-20nm) using both magnetometry and neutron scattering. Zero field cooled (ZFC)/field cooled (FC) magnetization curves at various fields show a peculiar peak at low temperatures instead at the Néel temperature of 120K. However, the AF order parameter of MnO shows the expected behavior vanishing around the Néel temperature as found from polarized neutron scattering studies. To resolve this apparent contradiction further magnetometry studies using hysteresis curves, memory effect measurements, TRM/IRM plots were employed. Hysteresis curves measured at various temperatures show an exchange bias effect indicating the coupling of an AF core to a ferromagnetic (FM)-like shell. In addition, ZFC data measured at various fields exclude a superparamagnetic scenario. Moreover, we have studied heterodimer ('Janus') particles, where a FM FePt particle is attached to the AF MnO particle. The magnetic coupling to the FePt subunit serves as a probe to help to identify the spin structure inside the MnO particles. We conclude that the magnetic behavior of MnO particles can be explained by a superposition of superparamagnetic-like thermal fluctuations of the AF-Néel vector inside an AF core and a strong magnetic coupling to a FM  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  or  $\text{Mn}_3\text{O}_4$  shell.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Geboren am 22.10.1986 in Neuwied

## Ausbildung

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 10/2010 – 10/2014 | Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Tremel, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz<br><br><i>„Biofunktionalisierung anorganischer Nanopartikel zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie“</i> |
| 01/2011 – 07/2011 | Diplomarbeit<br><br><i>„Synthese multifunktionaler Nanopartikel zur Anwendung in der Theranostic“</i>  |
| 18.07.2011        | <b>Diplomprüfung</b>   |
| 10/2006 – 07/2011 | Johannes Gutenberg-Universität Mainz,<br><b>Studium: Chemie (Diplom)</b>   |
| 10/2008 – 12/2010 | Hauptstudium, Schwerpunkte - Hauptstudium:<br><br><b>Anorganische Chemie</b><br><b>Analytische Chemie</b><br><b>Physikalische Chemie</b><br><b>Organische Chemie</b>   |
| 09/2003 – 07/2006 | David-Roentgen-Schule Neuwied – Berufsbildende Schule für Gewerbe und Technik<br><br>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  |



## **Berufliche Erfahrung**

02/2002	BlutanalySELabor Psychiatrisches Zentrum Nordbaden (PZN) in Wiesloch
08/2007 – 09/2007	Boehringer Ingelheim, Labor für Forschung und Entwicklung: Drug Delivery, Dichtigkeitsprüfung von Blistern
2007 – 2011	Gaul's Catering, Mainz
04/2009 – 07/2010	Betreuung des Übungsseminars „Anorganische Chemie für Anfänger“ (AC1) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
10/2009 – 03/2010	Betreuung des Praktikums „Anorganische Chemie für Fortgeschrittene“ (ACF) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2012 – 2013	Betreuung des Praktikums „Anorganische Chemie für Fortgeschrittene“ (ACF) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz