

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
Angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung

**Mikroskopische Analyse des
transmembranen Transports von
Nanopartikeln in Polymersome, riesige
unilamellare Vesikel und Erythrozyten**

vorgelegt von

Max Bernhardt

geboren in Neustadt/Aisch, Deutschland

Mainz, 2014

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Max Planck Institute for Polymer Research



Gegen die Infamitäten des Lebens sind die besten Waffen: Tapferkeit, Eigensinn und Geduld. Die Tapferkeit stärkt, der Eigensinn macht Spaß und die Geduld gibt Ruhe.

Hermann Hesse

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2011 bis Dezember 2014 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, unter der Betreuung von Prof. Dr. K. L. angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. H. F.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. L.

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. M.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2015

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei all jenen bedanken, welche auf die eine oder andere Weise zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuallererst bei Prof. Dr. K. L., die mir die Möglichkeit bot, in ihrem Arbeitskreis meine Doktorarbeit zu verfassen. Bei Prof. Dr. M. M. für die freundliche Übernahme des Zweitgutachters sowie Prof. S. W. für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Bei der MPG und dem Schwerpunktprogramm SPP1313 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung.

Bei Prof. Dr. G. F. und Dr. A. K. für das Mitbetreuen meiner Arbeit und bei einigen Mitarbeitern des MPIP, die mir bei den verschiedenen Methoden mit Rat und Tat zur Seite standen: Dr. I. L. und Ch. S., Dr. M. K. und U. R., Dr. M. W., Dr. V. M., A. K., Dr. M. M., der Feinmechanik und der Polymeranalytik (ganz besonderer Dank geht dabei an Ch. R., B. M., S. S. und U. H.).

Bei M. H. und M. D. (Carnegie Mellon University, Pittsburgh) die mir ihr Simulationen zur Verfügung stellten sowie Dr. N. B., S. K. und D. W. (Universität Basel), die mir bei der Synthese des Blockpolymers halfen.

Bei dem Team von *L. United*. Der Sieg des Fußballturniers am Sommerfest 2014 wird nie in Vergessenheit geraten.

Bei K., K., B., D. und U. für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei M., K., D., L. und all den lieben Kollegen, die den Alltag am MPIP durch gnadenlosen Optimismus einfacher machten. Bei A., F. und E., die von Kollegen zu Freunden wurden.

Natürlich bei meinen Eltern A. und D. sowie meinen Schwestern L. und S., die mich auf dem langen Weg durch Schule, Studium und Promotion immer unterstützten.

Zu guter Letzt bei meiner Frau K. und meinem Sohn D., die mir in guten und in schlechten Zeiten zur Seite standen, mich aufbauten, wenn es nötig war und sich mit mir freuten, wenn es was zum Freuen gab. *Prawdziwa miłość nie wyczerpuje się nigdy. Im więcej dajesz, tym więcej ci jej zostaje.* (Antoine de Saint-Exupéry)

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Weiterentwicklung eines entwickelten künstlichen Minimalmodells eines Membransystems und dessen Vergleich mit natürlichen Systemen. An dem Minimalmodell konnte der Prozess der Nanopartikelaufnahme physikalisch verstanden und gesteuert werden, bevor er dann schrittweise auf natürliche Zellen übertragen wurde.

Die Membran des Modellsystems besteht aus dem amphiphilen Polydimethylsiloxan-Polymethyloxazolin-Blockcopolymer (PDMS-*b*-PMOXA). Zu Beginn der Arbeit wurde die Synthese des Blockcopolymers (BCs) optimiert. Durch Variieren des PMOXA-Blockes konnten Informationen über den Einfluss der Blocklänge auf die mechanischen Eigenschaften der aus den verschiedenen BCs hergestellten Polymersome gewonnen werden.

Um das vorhandene System von Jaskiewicz et al. weiterentwickeln zu können, wurde von Polystyrol- und Siliciumdioxid-Partikeln auf Gold-Partikel übergegangen, welche leichter modifiziert werden können. Somit konnten positive, neutrale und negative Partikel hergestellt werden. Mit Hilfe der *Colloidal Probe*-Technik, einer speziellen AFM-Methode, wurde herausgefunden, dass die Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Polymersomen elektrostatischer Natur sind. Durch den Einsatz von

modifizierten Gold-Nanopartikeln (Durchmesser = 44 nm) konnten drei verschiedene Szenarien eingestellt werden: Aufnahme, Anlagerung und Koexistenz mit Polymersomen, was durch Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) verbildlicht wurde. Dabei konnte auch eine Vorstellung über den molekularen Aufbau der Membran gewonnen werden. Durch Verwenden von Gold-Nanostäbchen konnte ebenfalls mit Cryo-TEM gezeigt werden, dass die Form der Partikel keinen Einfluss auf die Aufnahme hat.

Mit dem Verständnis des Minimalmodells wurden die erlangten Erkenntnisse auf ein weiteres, der Natur ähnlicheres Modellsystem übertragen. Hierzu wurden riesige unilamellare Vesikel (giant unilamellar vesicles, GUVs) mit verschiedenen modifizierten, 1 μm großen Partikeln (aus Siliciumdioxid und Polystyrol) versetzt. Mittels Konfokalmikroskopie konnte bestätigt werden, dass auch in diesem System die Interaktion zwischen Partikeln und Vesikeln auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

In einem letzten Schritt wurde vom Modellsystem auf natürliche Zellen, rote Blutkörperchen, übergegangen. Dabei konnten einerseits Erkenntnisse, die aus den Modellsystemen erlangt wurden, bestätigt werden, andererseits wurde ein sehr interessantes Verhalten der Silizium-Partikel beobachtet.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde somit das vorhandene Modellsystem weiterentwickelt und erstmals daraus erlangte Kenntnisse durch sukzessives Übertragen auf natürliche Zellen angewendet.

Abstract

This thesis focuses on two main points. The first concentrates on the improvement of a recently developed artificial minimal model of a membrane system with which we were able to understand and control the uptake behavior of nanoparticles into polymeric vesicles (polymersomes). The second point aims at transferring the acquired knowledge step by step to a natural system - red blood cells.

The membrane of the minimal model system consists of the amphiphilic poly(dimethylsiloxane)-poly(2-methyloxazoline) block copolymer (PDMS-*b*-PMOXA). At the beginning of this work the synthesis of this block-copolymer (BC) was optimized. By varying the length of the PMOXA-block it was possible to gain information about the influence of the block length on the mechanical properties of the polymersomes produced.

To develop the system further, gold particles were used instead of silica and polystyrene particles as Jaskiewicz et al. had done. Gold particles can easily be modified and they show an intrinsic crystallinity, which gives access to new experiments in light scattering and plasmonics. By using immobilized, differently modified gold particles in atomic force microscopy (AFM) measurements (= *colloidal probe technique*), information about the interactions between those particles and polymersomes

could be gained. It was found that the dominant interactions are weak electrostatic interactions. By mixing polymersomes and gold-nanoparticles with a diameter of 44 nm, modified in the same different ways as for AFM experiments, their behavior towards polymersomes could be controlled. We were able to set different scenarios: uptake of particles into polymersomes, attachment of particles to the polymersomes and coexistence of particles and polymersomes. Those findings were proven by cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM). From these images one could also understand how the membrane is built up at the molecular level. Furthermore, modified gold-nanorods were used to study the influence of the nanoparticles's shape on the uptake into polymersomes. It was found that shape does not influence the uptake of particles into polymersomes.

The insight gained through an understanding of this minimal model system was transferred to a more natural model system. For this purpose, giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared and mixed with differently modified 1 μm particles (made of silica and polystyrene). These mixtures were analyzed with confocal laser scanning microscopy (CLSM). It was observed that here, too, the dominant interactions are electrostatic ones.

In a last step, experiments with red blood cells were carried out to transfer the knowledge gained from the model to a natural system, which confirmed some of the findings of the model systems. Furthermore, some very interesting behavior of silica particles was observed.

Within the scope of this thesis the existing model system was developed further and the interacting forces between particles and model system were uncovered. For the first time, information gained from a minimal model system was successively transferred to a model system and compared to a similar natural system - a line was drawn between a minimal model and nature.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	VIII
Zusammenfassung	X
Abstract	XII
Inhaltsverzeichnis	XV
1 Einführung	1
2 Grundlagen	5
2.1 Der Aufbau der Zelle	5
2.1.1 Allgemeiner Aufbau einer Zelle	6
2.1.2 Erythrozyten	7
2.2 Amphiphile und Selbstassemblierung	7
2.2.1 Lipide	8
2.2.2 Prinzip der Selbstassemblierung	9
2.2.3 Blockcopolymerer	11
2.3 Zellmodelle	13
2.3.1 Monolagen	14
2.3.2 Planare Lipiddoppelschichten	14
2.3.3 Liposome/Polymersome	15
2.3.4 Physikalische Eigenschaften von Membranen	18

2.4	Transmembraner Transport	20
2.4.1	Transportprozesse in der Biologie	21
2.4.2	Interaktion von Nanopartikeln mit Erythrozyten	22
2.4.3	Transmembraner Transport in Modellsystemen	24
3	Methoden und Materialien	33
3.1	Methoden	33
3.1.1	Konfokale Laser-Rastermikroskopie	34
3.1.2	Transmissionselektronenmikroskopie	35
3.1.3	Rasterkraftmikroskopie	37
3.1.4	Lichtstreuung	43
3.2	Materialien	44
3.2.1	Chemikalien	44
3.2.2	Partikel	47
4	Experimententeil	49
4.1	Synthese des Block-Copolymers	49
4.2	Herstellung der Lösungen	55
4.2.1	Herstellung der Polymervesikel	55
4.2.2	Herstellung von GUVs via <i>Continuous droplet interface crossing encapsulation</i>	56
4.2.3	Aufarbeiten der Erythrozyten	58
4.2.4	Modifizierung der Au-Nanostäbchen	59
4.2.5	Herstellung der Nanopartikel-Vesikel-Lösungen	59
4.3	Rasterkraft-Experimente	60
4.4	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie	63
5	Ergebnisse und Diskussion	65
5.1	Polymersome: Aufbau und Charakterisierung	66
5.1.1	Synthese des Blockcoplymers	66
5.1.2	Polymersom-Herstellung	70

5.1.3	Bestimmung der Membrandicke der Polymersome	70
5.1.4	Physikalische Eigenschaften der Polymersome	74
5.2	Polymersom-Nanopartikel-Interaktion	77
5.2.1	Analyse der Wechselwirkungen zwischen verschieden modifizierten Partikeln und Polymersomen mittels AFM	78
5.2.2	Interaktion verschieden modifizierter Nanopartikel mit Polymersomen	83
5.2.3	Energetische Betrachtungen der NP-Aufnahme	88
5.2.4	Molekulares Verhalten der BCs in der Membran	91
5.2.5	Einfluss der Form der Nanopartikel auf die Aufnahme in Polymersome	97
5.3	Das GUV-Modellsystem	101
5.3.1	Charakterisierung der GUVs und der verwendeten Partikel . .	102
5.3.2	Interaktion verschiedener Mikropartikeln mit GUVs	104
5.4	Vom Modellsystem zur Natur	108
5.4.1	Charakterisierung der Erythrozyten und der verwendeten Partikel	109
5.4.2	Interaktion verschiedener Mikropartikeln mit Erythrozyten . .	110
6	Zusammenfassung und Ausblick	117
	Anhang	121
	Tabellen	123
	Lebenslauf	127
	Veröffentlichungen	129
	Abkürzungen	131
	Literaturverzeichnis	147
	Erklärung	149

Die meisten Darreichungsformen pharmazeutischer Wirkstoffe haben deren unselektive Verbreitung im Körper zur Folge. Daher sind - relativ zur tatsächlich benötigten Wirkstoffmenge - hohe Dosierungen vonnöten, um die erwünschte Wirkung zu erzielen. Dies zieht in vielen Fällen unerwünschte Nebenwirkungen nach sich, die zu starken Beeinträchtigungen, im Extremfall zum Tod des Patienten führen können.

Ein wesentliches Ziel der modernen Medizin ist es deshalb, Wirkstoffe besser in das gewünschte Zielgewebe zu transportieren, beziehungsweise sie dort selektiv freizusetzen (Drug Targeting). Dies kann zum Beispiel chemisch erreicht werden, indem geeignet modifizierte Wirkstoffmoleküle erst im spezifischen Milieu des Zielgewebes aktiviert werden. Ein weiterer möglicher Ansatz ist die Vektorisierung, bei der die Wirkstoffe durch maßgeschneiderte Transportvehikel an den Einsatzort gelangen. Hier wird das entsprechende Pharmazeutikum in einem Träger, wie zum Beispiel einem Nanopartikel, einem Dendrimer oder einer Nanokapsel, inaktiviert. Dieser diffundiert im Körper, bis ein Liganden-Rezeptor-System zur Bindung im Zielgewebe führt und die Freisetzung dort stattfinden kann [1–5].

Die Frage ist, über welche Mechanismen der Wirkstoff vom Träger in die Zellen gelangen soll. In der Zellbiologie ist der Prozess der Endozytose ubiquitär. Bei die-

sem steuern verschiedene auf der Zellmembran lokalisierte Proteine und Enzyme den Transport von Ionen, Makromolekülen oder Partikeln in das Zellinnere. Es konnten bisher viele unterschiedliche Mechanismen der Partikelaufnahme beschrieben werden. Ein komplettes Verständnis aller Aufnahmemechanismen ist jedoch noch lange nicht erreicht [6–10]. Es existieren allerdings Studien über den Einfluss von Parametern wie Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit auf die Aufnahme in Zellen und auf die Zelltoxizität der Partikel [11–14].

Neben dem endozytotischen Aufnahmeweg konnte auch die nicht-endozytotische Aufnahme von Partikeln nachgewiesen werden, indem alle für den endozytotischen Weg relevanten Proteine und Enzyme blockiert wurden. Dieser Aufnahmeprozess ist rein physikalischer Natur und konnte auf molekularer Ebene noch nicht verstanden werden [15, 16].

Da die Arbeit mit dem komplexen System “Zelle“ sehr aufwendig ist, bietet es sich an, ein einfacheres Modellsystem zu verwenden, an dem der Aufnahmeprozess besser verstanden werden kann. Es existiert eine Vielzahl von Zell-Modellsystemen wie Monolagen [17–19], planare Lipiddoppelschichten [20–22], porenüberspannende Lipidmembranen [23, 24] oder vesikuläre Systeme [25, 26]. Letztere sind aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur den realen Zellen am ähnlichsten und somit am interessantesten.

Eine Untergruppe sind Vesikel aus Block-Copolymeren, so genannte Polymersome. Erstmals von Eisenberg et al. publiziert [27], zogen sie rasch großes Interesse auf sich, indem sie als Transportvehikel oder Mikroreaktoren eingesetzt wurden [28–32]. Jaskiewicz et al. waren die ersten, die Polymersome als minimale Zellmodelle erforschten und daran die nicht-endozytotische Aufnahme von Nanopartikeln analysierten. Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Nanopartikelaufnahme, wie oben erwähnt, rein physikalischer Natur ist und sowohl größen- als auch konzentra-

tionsabhängig ist. Es war jedoch nicht geklärt, was die treibende Kraft hinter der Partikelaufnahme ist und ob die Form der Partikel einen Einfluss darauf hat. Eine grundlegende Frage war, ob die erlangten Erkenntnisse auf reale Zellen übertragbar sind. Diese offenen Fragen werden in dieser Dissertation behandelt.

Die vorliegende Arbeit adressiert zwei wesentliche Fragen zum Drug Targeting. Zum einen wird analysiert, inwieweit die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel durch deren Oberflächenmodifizierung und Form beeinflusst wird und ob sich daraus die Möglichkeit der gezielten Steuerung ergibt, um anderen wird auf die Fragestellung eingegangen, ob die anhand des Modellsystems gewonnenen Erkenntnisse auf reale Zellen übertragbar sind.

Nach einer theoretischen Einführung der Grundlagen in Kapitel 2 werden in Kapitel 3 alle angewendeten Methoden sowie alle verwendeten Chemikalien und Partikel erläutert. In Kapitel 4 wird das experimentelle Vorgehen beschrieben, durch welches das Modellsystem hergestellt und charakterisiert wurde. Im anschließenden Kapitel 5 werden die erhaltenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

In diesem Kapitel werden die Grundbausteine dargestellt, welche Bestandteil der Forschung zum Thema *Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Polymersomen* waren. Nach einem einführenden Abschnitt über Zellen und speziell über Erythrozyten wird auf den molekularen Aufbau der Zellmembran eingegangen. Deren Hauptbestandteile, die Lipide, werden genauso wie Blockcopolymere eingeführt und miteinander verglichen, um dann Vesikel als Zellmodelle einzuführen. Zum Abschluss wird der aktuelle Stand der Forschung zum Thema *Aufnahme von Nanopartikeln in Zellmodelle* dargestellt.

2.1 Der Aufbau der Zelle

Die Anzahl an Zellen im menschlichen Körper ist im wahrsten Sinne des Wortes astronomisch. Sie ist etwa drei Größenordnungen größer als die Zahl an Sternen in der Milchstraße. Gemessen an ihrer unglaublichen Anzahl, ist die Vielfalt an Zellen jedoch sehr gering. Es existieren nur etwa 200 verschiedene Zelltypen unter den ca. 10^{14} Zellen, die unseren Körper aufbauen [33].

2.1.1 Allgemeiner Aufbau einer Zelle

Der allgemeine Aufbau einer Zelle ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Nach außen hin wird die Zelle durch die Zellmembran abgetrennt. Diese biologische Membran stellt eine dünne Trennschicht dar, welche als selektive Barriere wirkt. Sie reguliert den Transport von Molekülen und Ionen. Ein Hauptmerkmal der Zellmembran ist, dass sie sowohl fließend, als auch höchst geordnet ist, wie es im Fluid-Mosaik-Modell biologischer Membranen angenommen wird [34]. Zellmembranen verschiedener Zellen zeigen stark unterschiedliche Zusammensetzungen bezogen auf die Oberflächenladung, Lipid-Zusammensetzung, Cholesterol- und Proteingehalt oder die Krümmung der Zelle. Lipide sind ein Hauptbestandteil der Zellmembran und werden im nächsten Kapitel genauer betrachtet.

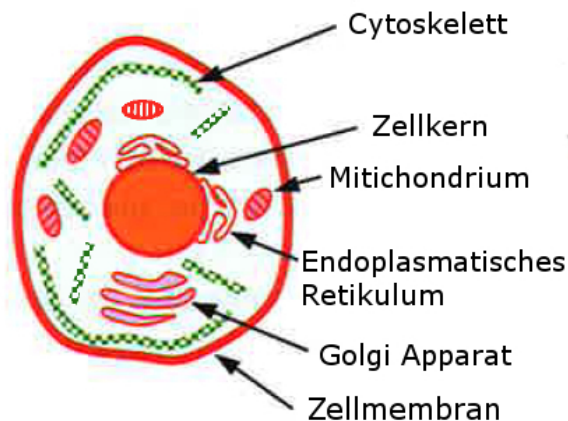


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer Zelle. Angepasst mit Erlaubnis der Cambridge University Press nach [33].

Im Inneren der Zelle befinden sich verschiedene Organellen. Die wichtigsten sind [33]:

- Der **Zellkern** mit einem Durchmesser von 3 bis 10 μm , der fast die ganze DNA der Zelle beinhaltet.
- Das **Endoplasmatische Reticulum**, welches den Zellkern umgibt und der Ort ist, an dem Proteine synthetisiert werden.

- Der **Golgi-Apparat**, welcher ein wichtiger Teil des Zellstoffwechsels ist. Er bildet kleine Vesikel, die Proteine und andere Materialien an verschiedene Regionen der Zelle transportieren.
- Das **Mitochondrium**, welches Adenosintri-phosphat, den Energieträger der Zelle, produziert.

Wie zu sehen ist, ist eine *normale* Zelle ein sehr komplexes System. Im Rahmen dieser Arbeit sind lediglich die einfachsten Zellen, rote Blutkörperchen, von Interesse.

2.1.2 Erythrozyten

Im Vergleich zu anderen Zellen fehlen roten Blutkörperchen (Erythrozyten, RBCs) einige Organellen, wie Zellkern oder Mitochondrium. RBCs zeigen eine bikonkave Gestalt, wobei sie etwa die Ausmaße einer Scheibe mit einem Durchmesser von $7,5\ \mu\text{m}$ und eine Dicke von $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ haben (siehe Abbildung 2.2) [35]. Das Innere der Zelle, das Zytoplasma, besteht vor allem aus Wasser (63 %) und Hämoglobin (33 %). Die Zellmembran setzt sich aus Proteinen (49 %), Lipiden (43 %) und Kohlenhydraten (8 %) zusammen, wobei Proteine, die am endozytotischen Aufnahmeprozess (siehe Kapitel 2.4) beteiligt sind, fehlen. Stabilisiert wird die Membran von innen durch Spektrin-Filamente, die durch kurze Aktin-Filamente vernetzt sind [36]. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie von den natürlichen Zellen dem in dieser Arbeit verwendeten Modell, welches weiter hinten eingeführt wird, am ähnlichsten.

2.2 Amphiphile und Selbstassemblierung

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, sind Lipide ein Hauptbestandteil der zellulären Membran. Im Folgenden werden diese Moleküle und ihr Verhalten betrachtet und ein Vergleich zu Blockcopolymeren hergestellt.

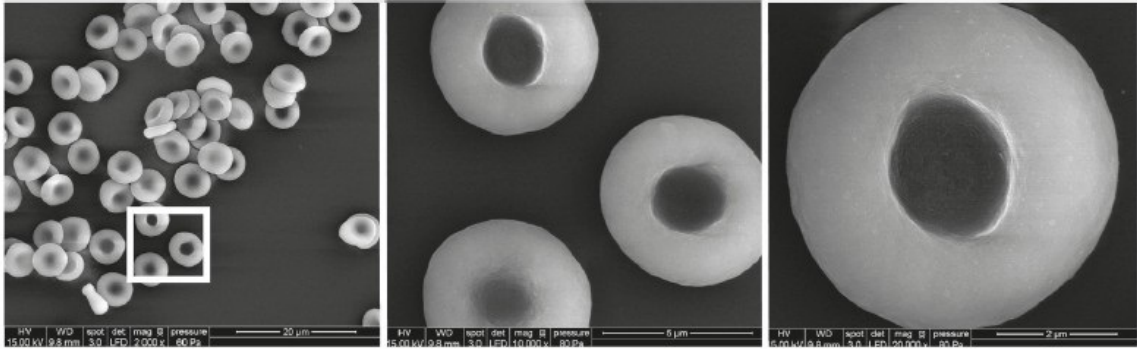


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von RBCs. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [37].

2.2.1 Lipide

Lipide stellen einen Vertreter amphiphiler Moleküle dar. Amphiphile sind Moleküle mit zwei unterschiedlichen Regionen: eine mit einer hohen, eine andere mit einer geringen Affinität zum Lösungsmittel. Im Falle des Lösungsmittels Wasser bestehen solche Moleküle typischerweise aus polaren, ionischen oder zwitterionischen Kopfgruppen und unpolaren Seitenketten. In Zellen findet man hauptsächlich verschiedene Phospholipide.

Phospholipide werden in zwei Klassen unterteilt - Phosphoglyceride und Sphingophospholipide (siehe Abbildung 2.3). Erstere bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe, die ein Phosphat enthält und über eine Glycerolgruppe mit zwei hydrophoben Schwänzen verbunden ist. Sphingophospholipide sind aus einem Sphingosin-Rückgrat aufgebaut und besitzen einen hydrophoben Schwanz. Die Kopfgruppe kann neutral, geladen oder zwitterionisch sein. Die hydrophoben Schwänze bestehen aus gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen mit 10-20 Kohlenstoffatomen.

Eine Untergruppe der Phosphoglyceride sind Lecithine, die aus Fettsäuren, Glycerin, Phosphorsäure und einer Cholin-Kopfgruppe bestehen (siehe Abbildung 2.3). Sie sind Bestandteil tierischer und pflanzlicher Zellmembranen und können aus diesen

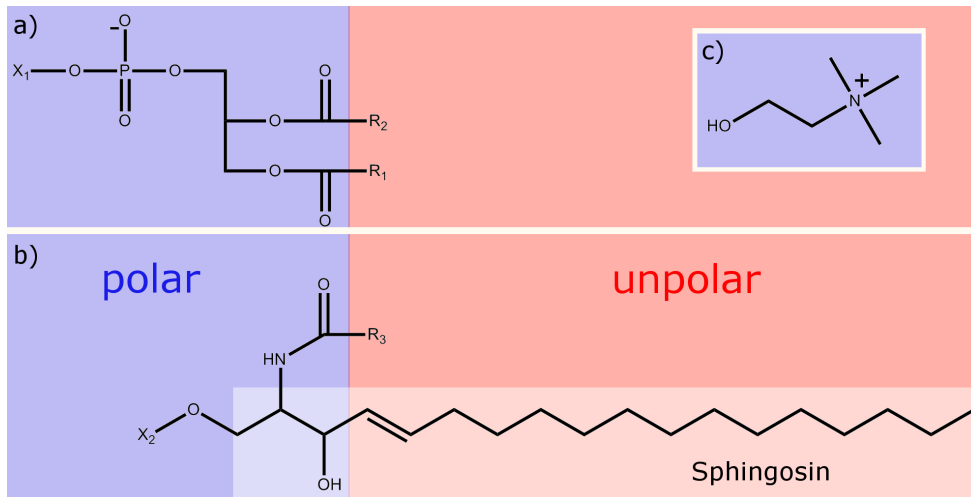


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Phospholipidklassen a) Phosphoglyceride und b) Sphingophospholipide, wobei R_i für beliebige Fettsäurereste und X_i für die Kopfgruppe steht; c) Strukturformel des Cholins, welches die Kopfgruppe in Lecithin ist.

extrahiert werden. Die genaue Zusammensetzung der Lecithine hängt von der entsprechenden Quelle ab. Als Basis dienen zum Beispiel Sojabohnen oder Eiweiß [38].

2.2.2 Prinzip der Selbstassemblierung

Lipide sind nur zu einer bestimmten Konzentration in Wasser löslich ($\approx 10^{-10}$ mol/l) [39]. Oberhalb dieser kritischen Mizellbildungskonzentration bilden sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen Aggregate, indem sich die lipophilen Schwänze zusammen lagern, um die Wechselwirkung mit Wasser zu verringern. Andererseits stoßen sich die hydrophilen Köpfe aus sterischen und elektrostatischen Gründen voneinander ab. Daraus resultiert eine optimale Oberfläche A , die von den Kopfgruppen beansprucht wird. Welche dreidimensionale Struktur gebildet wird, hängt vom kritischen Packungsparameter P ab:

$$P = \frac{V}{Al} \quad (2.1)$$

wobei V das Volumen und l die Länge des Lipids ist [40].

Daraus können Rückschlüsse auf die Form des gebildeten Aggregates gezogen werden, indem ein Zusammenhang zwischen dem Packungsparameter P und der mittleren Krümmung H sowie der Gaußschen Krümmung K gezogen wird (Siehe Abbildung 2.4) [28, 41]:

$$P = \frac{V}{Al} = 1 + Hl + \frac{Kl^2}{3} \quad (2.2)$$

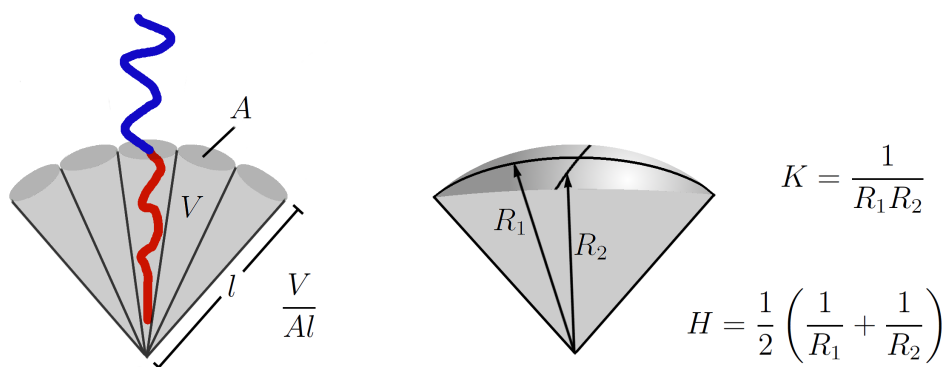


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Packungsparameters P und der mittleren Krümmung H sowie Gaußschen Krümmung K . Angepasst mit Erlaubnis von Wiley-VCH nach [28].

Die gebildeten Strukturen reichen von der sphärischen Mizelle ($P < 1/3$), über die flexible Doppelschicht, wie sie in Vesikeln zu finden sind ($P = 1/2 - 1$), bis hin zu inversen Mizellen ($P > 1$), nur um die Extrembeispiele zu nennen (siehe Abbildung 2.5). Die annähernd zylindrische Form der Lipide in Wasser führt dazu, dass sich bevorzugt Strukturen mit geringem Krümmungsradius bilden. Zwei Monolagen aus Lipiden lagern sich zu einer Lipiddoppelschicht zusammen, wobei die hydrophoben Bereiche in Kontakt sind. Die so entstandenen Vesikel oder lamellaren Phasen können als zweidimensionales System mit einer Dicke von 4-5 nm und einer lateralen Ausdehnung im Mikrometerbereich angesehen werden [17, 39].

2.2. AMPHIPHILE UND SELBSTASSEMBLIERUNG

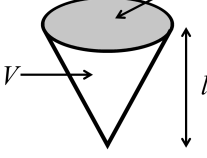
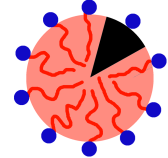
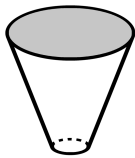
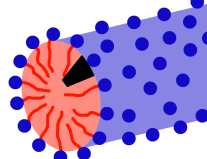
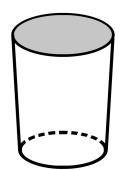
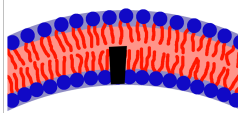
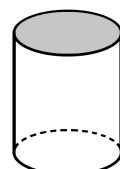
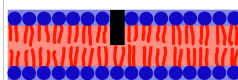
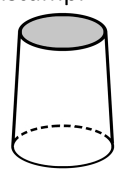
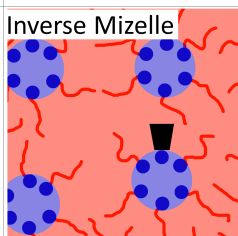
	Kritischer Packungsparameter V/A	Form des Amphiphils	Sich ergebende Struktur
Amphiphile mit einer hydrophoben Kette und großer Kopfgruppe	$< 1/3$	Kegel 	Sphärische Mizelle 
Amphiphile mit einer hydrophoben Kette und kleiner Kopfgruppe	$1/3 - 1/2$	Kegelstumpf 	Zylindrische Mizelle 
Amphiphile mit zwei hydrophoben, fluiden Ketten und großer Kopfgruppe	$1/2 - 1$	Kegelstumpf 	Vesikel, Flexible Lipiddoppelschicht 
Amphiphile mit zwei hydrophoben Ketten und kleiner Kopfgruppe	≈ 1	Zylinder 	Planare Lipiddoppelschicht 
Amphiphile mit zwei hydrophoben, mehrfach ungesättigten Ketten und kleiner Kopfgruppe	> 1	Invertierter Kegelstumpf 	Inverse Mizelle 

Abbildung 2.5: Schematische Darstellung verschiedener, von Lipiden in Wasser gebildeten Aggregaten. Angepasst mit Erlaubnis von Elsevier nach [39].

2.2.3 Blockcopolymer

Ein ähnliches Verhalten, wie das eben beschriebene, zeigen amphiphile Blockcopolymer, eine Untergruppe von Polymeren. Ein Polymer ist ein großes Molekül, welches

aus der Aneinanderreihung kleiner Wiederholungseinheiten, den so genannten Monomeren, besteht. Monomere werden durch kovalente Bindungen miteinander verbunden, um ein Makromolekül zu bilden. Polymere werden hinsichtlich ihrer Architektur klassifiziert. Die prominentesten Klassen sind lineare und verzweigte Polymere sowie Dendrimere [42].

Polymere, die nur aus einer Sorte von Monomeren bestehen, nennt man Homopolymere. Polymere aus mehreren verschiedenen Monomeren nennt man Copolymere. Lineare Copolymere mit zwei unterschiedlichen Monomeren werden nach ihrer Zusammensetzung klassifiziert, welche in Abbildung 2.6 dargestellt sind.

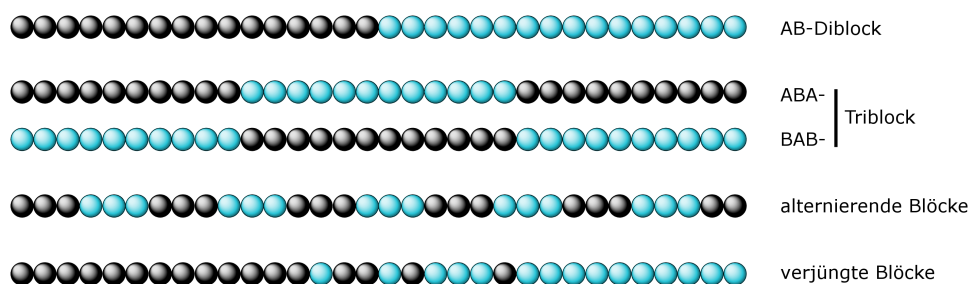


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der verschiedenen linearen Copolymer-Klassen. Angepasst mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry nach [43].

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind Diblock-Copolymere mit nicht mischbaren Blöcken (BCs). Im Bulk zeigen BCs Mikrophasenseparierung. Abhängig von der molekularen Zusammensetzung der BCs können verschiedene Morphologien wie Kugeln, Lamellen, hexagonal gepackte Zylinder, Gyroide und andere bikontinuierliche Strukturen erhalten werden. Welche Struktur gebildet wird, hängt vom Grad der Polymerisierung, dem Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter und dem Volumenanteil der einzelnen Blöcke ab [43–45].

In Lösungsmitteln besitzen BCs die Eigenschaft durch Selbstassemblierung die ganze Bandbreite an Strukturen zu bilden, welche schon für Lipide in Abschnitt 2.2.2

diskutiert wurden [27, 43, 46]. Exemplarisch sind einige Strukturen in Abbildung 2.7 dargestellt. Vesikel aus BCs nennt man Polymersome, welche erstmals von Eisenberg und Zhang 1995 publiziert wurden [47] und Grundbestandteil dieser Arbeit sind.

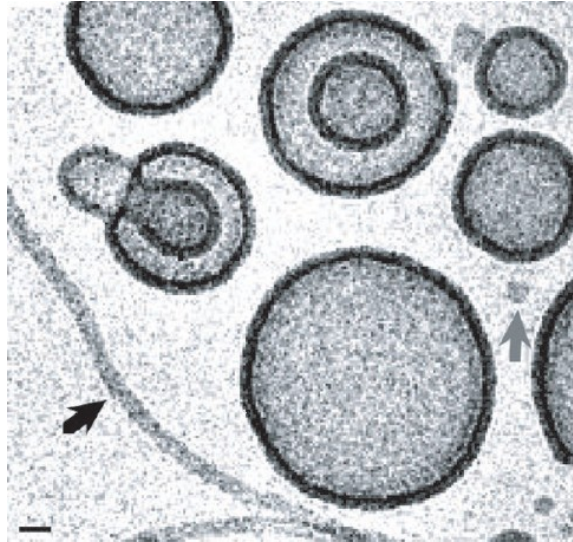


Abbildung 2.7: Cryo-TEM-Aufnahme von BC-Aggregaten, die sowohl Polymersome, als auch *rodlike* (schwarzer Pfeil) und sphärische Mizellen (grauer Pfeil) zeigen. Angepasst mit Erlaubnis der American Association for the Advancement of Science nach [46].

2.3 Zellmodelle

Um grundlegende Eigenschaften von biologischen Membranen herausfinden zu können, ist es sinnvoll eine vereinfachte Membran zu analysieren. Zu Beginn war die Forschung vorwiegend darauf fokussiert, die physikalischen Eigenschaften zu erhalten. Später wurden einfache Membrane als biomimetisches Modellsystem angesehen, indem biologisch aktive Spezies, wie zum Beispiel Proteine, in die Membran eingebaut wurden [22]. Die Modellsysteme können in Monolagen, planare Lipiddoppelschichten und Vesikel (Liposome und Polymersome) klassifiziert werden. Aus jedem Modellsystem können wichtige Informationen gewonnen werden. Jedes System hat Vor- und

Nachteile, welche im Folgenden diskutiert werden [48].

2.3.1 Monolagen

Amphiphile, wie Phospholipide, bilden an der Luft-Wasser-Grenzfläche einen monomolekularen Film, der auch Langmuir-Monolage genannt wird. Solch ein Film wird erhalten, indem man die in einem flüchtigen Lösungsmittel gelösten Lipide auf der Wasseroberfläche in einer Filmwaage spreitet, und das Solvent verdampfen lässt. Durch Verringerung der Oberfläche wird der Filmdruck erhöht und das Verhalten der Lipide kann abhängig vom Druck analysiert werden. Mit dieser Methode kann besonders gut die Einlagerung von Molekülen in die Membran studiert werden. Allerdings repräsentiert ein Monolayer die Natur nur geringfügig [17–19].

2.3.2 Planare Lipiddoppelschichten

Adsorbierte Lipiddoppelschicht

Adsorbierte Lipiddoppelschichten können durch eine Filmwaage oder spontane Vesikelfusion auf anorganischen Substraten hergestellt werden. Dabei ist es möglich, eine Vielzahl von Lipiden zu verwenden. Hauptvorteile sind die Stabilität des Filmes und die Möglichkeit, asymmetrische Filme herzustellen [20]. Diese Methode der Filmherstellung ermöglicht es, die Filme anschließend zu transferieren und analysieren, zum Beispiel mittels Rasterkraftmikroskopie [22], Fluoreszenztechniken [21] oder Streuexperimenten [49]. Der Nachteil ist, dass die Lipiddoppelschicht aufgrund der Adsorption nicht flexibel ist.

Porenüberspannende Lipidmembran

Porenüberspannende Lipidmembranen, besser bekannt als *Black Lipid Membranes*, werden vor allem durch Überstreichen der Lipidlösung über die Poren oder Formen von gefalteten Bilayern hergestellt [23, 24]. Die entstandene Lipiddoppelschicht überspannt eine Pore, die zwei Wassergefäße verbindet. Im Vergleich zu den ersten beiden Methoden entsteht hier eine freistehende Lipiddoppelschicht. Hierdurch kann mit Leitfähigkeitsmessungen der Transport durch die Membran analysiert werden. Die Stabilität dieser Membranen ist allerdings sehr gering [50].

2.3.3 Liposome/Polymersome

Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten Vesikel herzustellen, wie z.B. die Elektroformation, mikrofluidische Methoden, die Bulk-Rehydrierung, die Rehydrierung von vorbehandelten Substraten, der Lösungsmittelwechsel und die Film-Rehydrierung. Im Folgenden werden die drei wichtigsten Vertreter kurz dargestellt [29].

Angelova und Dimitrov waren die ersten, die Vesikel im Bereich von 5 - 150 μm durch Elektroformation herstellten. Ein Lipidfilm wird auf ein leitfähiges Substrat aufgetragen und getrocknet. Anschließend wird wässriges Medium hinzugegeben und Wechselspannung angelegt. Die so entstandenen Vesikel haben jedoch eine breite Größenverteilung [25, 26].

Bei dem Lösungsmittelwechsel wird das Amphiphil gelöst und diese Lösung langsam in Wasser getropft, wodurch der hydrophobe Teil des Amphiphils ausfällt und Vesikel gebildet werden. Das Lösungsmittel kann durch Dialyse oder Verdampfen entfernt werden, wobei jedoch immer Spuren des Lösungsmittels zurückbleiben, was der Hauptnachteil dieser Methode ist [29–31].

Bei der Film-Rehydratation wird durch Lösungsmittelverdampfen ein Polymerfilm hergestellt, zu dem nach Trocknen Wasser gegeben wird [31]. Durch Rühren lösen sich kleine Stücke des Polymerfilms, wobei sich planare, scheinchenförmige Lipiddoppelschichten bilden, an deren Kante hydrophile Ketten dem Wasser exponiert sind. Die Energie einer solchen Scheibe ist:

$$E_{Scheibe} = 4\pi R_V \Lambda \quad (2.3)$$

wobei R_V der Radius der Scheibe und Λ die Kantenspannung ist. Um die energetisch ungünstige Situation an den Kanten zu verhindern, kann sich die Scheibe zu einer sphärischen Struktur zusammenlagern, die Vesikel genannt wird. Eine schematische Darstellung dieses Prozesses ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Hierbei muss die Biegeenergie:

$$E_{biege} = 4\pi(2\kappa_B + \kappa_G) \quad (2.4)$$

überwunden werden, wobei κ_B die Biegesteifheit und κ_G die Gaußsche Biegesteifheit ist. Beide Größen sind Materialkonstanten. Ob eine Scheibe oder ein Vesikel vorliegt, hängt vom Radius der Scheibe ab. Für kleine R_V ist die Scheibe stabiler. Ist der Radius der Scheibe größer als der kritische Radius:

$$R_V^k = \frac{2\kappa_B + \kappa_G}{\Lambda} \quad (2.5)$$

ist die sphärische Form favorisiert [33].

Simulationen zeigen ein anderes mögliches Szenario auf, in dem Vesikel nicht durch Schließen einer planaren Doppelschicht entstehen, sondern sich aus Mizellen heraus entwickeln, welche wachsen und die Morphologie ändern. Für beide Theorien konnten experimentelle Beweise gefunden werden, woraus zu folgern ist, dass die Vesikelbildung ein höchst komplexer Prozess ist, der noch lange nicht ganz verstanden ist [29, 51, 52].

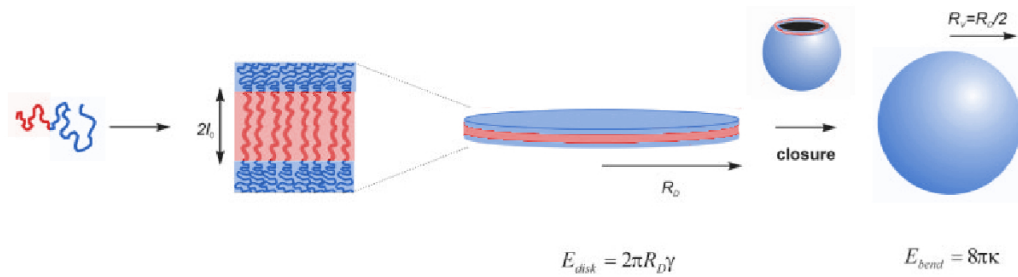


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Vesikelbildung. Angepasst mit Erlaubnis von Wiley-VCH nach [28].

Bei allen beschriebenen Methoden können sowohl unilamellare, als auch multilamellare Vesikel entstehen. Erstgenannte werden abhängig von ihrer Größe in drei Klassen unterteilt: kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUVs; 20 - 100 nm), große unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles, LUVs; 100 - 500 nm) und riesige unilamellare Vesikel (giant unilamellar vesicles, GUVs; 0.5 - 100 μm) [53, 54]. Anwendung finden Vesikel als Wirkstofftransport-Systeme [4, 29, 55–57], Mikroreaktoren [29, 58–60] oder, wie schon erwähnt, als minimale Zellmodelle [29, 61, 62].

Es gibt mehrere Gründe dafür, Vesikel als minimale Zellmodelle anzusehen [25]:

- (1) Die Zellwand und die Membran der Vesikel sind von Art und Aufbau vergleichbar [61];
- (2) Die Herstellung von Vesikeln in definierten Größen ist gut erforscht [63–68];
- (3) Wie natürliche Zellen können sich auch Vesikel verformen und ein Verknospen sowie Abschnüren zeigen [69–72].

Des Weiteren können vor allem in Liposomen eine Vielzahl an *natürlichen* Reaktionen durchgeführt werden, zum Beispiel eine enzymatische Synthese von Nukleinsäuren [73, 74], Protein-Expression [75, 76] oder eine autokatalytische Synthese von Zucker [77].

Es stellt sich nun die Frage, was die Unterschiede zwischen Polymersomen und Liposomen sind, abgesehen von ihren molekularen Bausteinen. Eine Übersicht dazu gibt Abbildung 2.9, in der Eigenschaften wie Fluidität, Stabilität und Permeabilität in Abhängigkeit der molaren Masse der Amphiphilen dargestellt sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Polymersome im Vergleich zu Liposomen stabiler, aber im Allgemeinen auch steifer sind und eine geringere Permeabilität zeigen [27,28,32].

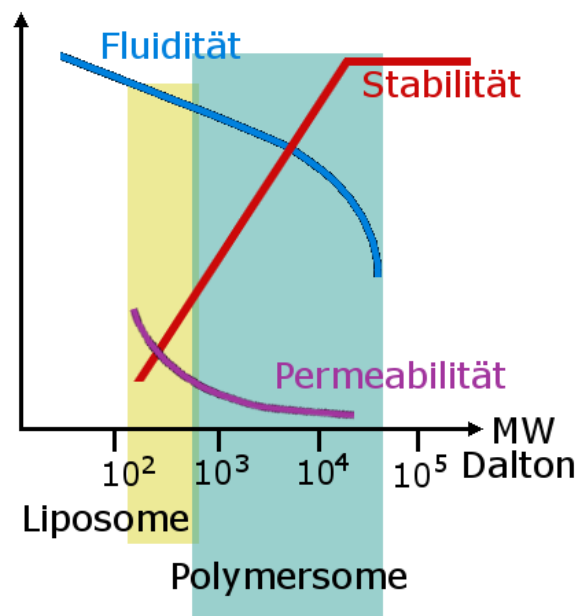


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung von Fluidität und Stabilität gegen die molare Masse der Amphiphile. Liposome werden normalerweise aus Amphiphilen mit $M_w < 1$ kDa hergestellt. Polymersome können auch aus größeren Amphiphilen bestehen; dadurch gewinnen sie an Stabilität, aber verlieren an Fluidität. Angepasst mit Erlaubnis der American Association for the Advancement of Science nach [27].

2.3.4 Physikalische Eigenschaften von Membranen

Die mechanischen Eigenschaften einer Membran können durch die drei Größen Druckfestigkeit K_A , Biegesteifheit κ_B und Kantenspannung Λ charakterisiert werden.

In erster Näherung kann die Membran als flache Platte der Dicke d angesehen werden. Die Druckfestigkeit kann durch:

$$K_A = \frac{dK_V}{4/9 + K_V/3\mu} \quad (2.6)$$

beschrieben werden, wobei K_V die Volumenkompressionen und μ die Schubmodule in allen drei Dimensionen sind. Da K_V und μ Bulk-Eigenschaften sind, ist K_A somit linear proportional zur Dicke d der Platte. Bei dieser Näherung wird jedoch vernachlässigt, dass sich die Moleküle einer Membran durch den ausgeübten Druck umlagern können. Unter Berücksichtigung dessen ergibt sich die Druckfestigkeit einer Monolage bzw. einer Lipiddoppelschicht (LDS) zu:

$$K_A^{mono} = 2\gamma \quad K_A^{LDS} = 4\gamma \quad (2.7)$$

wobei γ die Oberflächenspannung ist. Experimentell können für die Oberflächenspannung Werte von 0,02-0,05 J/m² für Monolagen und 0,08-0,2 J/m² für Lipiddoppelschichten gefunden werden, welche unabhängig von der Dicke der Lipiddoppelschicht sind [33, 78].

Zum Verformen einer Membran (siehe Abbildung 2.10) muss Energie aufgewendet werden. Dabei wird die eine Seite zusammengedrückt, während die andere Seite gestreckt wird. Diese Energie steigt, bezogen auf eine Flächeneinheit, mit der Krümmung der Membran an. Die Energiedichte \mathcal{F} hängt von der quadratischen mittleren Krümmung $(1/R_1 + 1/R_2)^2$ und der Gaußschen Krümmung $(1/R_1 R_2)$ ab:

$$\mathcal{F} = \frac{\kappa_B}{2} \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 + \frac{\kappa_G}{R_1 R_2} \quad (2.8)$$

Die Druckfestigkeit K_A und die Biegesteifheit κ_B hängen über:

$$\kappa_B = K_A d^2 / a \quad (2.9)$$

zusammen, wobei a eine numerische Konstante ist, welche vom System abhängt (z.B. $a = 12$ für eine Kugel) [33]. Experimentell werden diese physikalischen Größen vor allem durch Micropipettenaspiration [79–81] oder Rasterkraftmikroskopie [82–84] bestimmt. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

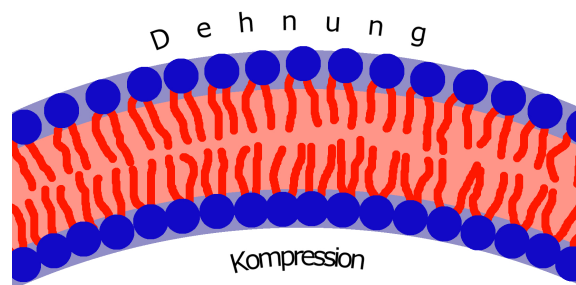


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Kompression und Streckung einer Membran bei deren Deformierung. Angepasst mit Erlaubnis der Cambridge University Press nach [33].

Tabelle 2.1: Physikalische Eigenschaften einiger Lipid- und Zellmembran [33]

Probe	$K_A / \text{J/m}^2$	Quelle	$\kappa_b / 10^{-19} \text{ J}$	Quelle
DMPC	0,140 - 0,150	[85, 86]	0,46-1,30	[87, 88]
DOPC	0,237	[85]	0,85	[85]
Egg PC	0,14-0,17	[89, 90]	0,4-2	[91–93]
Erythrozyten	0,45	[94, 95]	0,13-9	[87, 96, 97]

2.4 Transmembraner Transport

Der transmembrane Transport von Nanopartikeln ist ein zentrales Thema dieser Arbeit. Um die Ergebnisse verstehen und interpretieren zu können, wird zunächst der

Aufnahmeprozess in biologischen Zellen kurz dargestellt und dann theoretisch und experimentell auf die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellemodelle eingegangen.

2.4.1 Transportprozesse in der Biologie

Wie in Abschnitt 2.1 dargestellt, wird das Zellinnere von der äußeren Umgebung durch eine Plasmamembran abgetrennt, welche aus vielen verschiedenen Lipiden besteht. Proteine, die für die unerlässlichen funktionellen Eigenschaften der Biomembran zuständig sind, sind in die Zellwand eingebettet oder auf ihr verankert [8]. Eine dieser Eigenschaften ist die Beförderung von Ionen, Molekülen und Partikeln durch die Membran. Kleine Moleküle wie Aminosäuren, Zucker oder Ionen können durch (Protein-)Pumpen oder (Ionen-)Kanäle in das Innere der Zelle transportiert werden. Größere Moleküle oder Partikel können durch Vesikelbildung aufgenommen werden. Dieser Prozess wird als Endozytose bezeichnet und in verschiedene Unterkategorien unterteilt, die im Folgenden beschrieben werden (siehe Abbildung 2.11) [98]:

- **Phagozytose** ist die Internalisierung von großen Molekülen, indem die Membran ein Teilchen einhüllt. An diesem Prozess sind mehr als 140 Proteine beteiligt, wodurch die Phagozytose ein sehr komplexer und noch nicht ganz verstandener Mechanismus ist [10].
- **Pinozytose** ist die Aufnahme von kleinen Teilchen, Flüssigkeiten und gelösten Stoffen. Sie kann in vier Mechanismen unterteilt werden:
 - **Makropinozytose** beschreibt das stimulierte Auffalten der Membran, die dann über Partikel ($> 1 \mu\text{m}$) zusammenfällt, mit der Zellmembran verschmilzt und so einschließende Vesikel bildet.
 - Die **Clathrin-vermittelte Endozytose** ist der am besten verstandene Mechanismus und gilt für Teilchen mit $\sim 120 \text{ nm}$ Durchmesser. Die Aufnahme erfolgt hierbei in fünf Schritten. Auf eine detaillierte Beschreibung wird hier verzichtet [9].

- **Caveolae-vermittelte Endozytose:** Eine Caveolae ist eine sackförmige Einbuchtung der Plasmamembran. Befinden sich Teilchen (~ 60 nm) in der Caveolae, wird die Vesikelbildung durch eine Signalkaskade ausgelöst.
- Die **Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose** basiert auf sogenannten *Rafts*, was kleine Strukturen in der Membran sind, die sich frei auf der Oberfläche bewegen. Es wird angenommen, dass die Vesikelbildung vom Cargo (~ 90 nm) selbst abhängt [98].

Forschergruppen haben festgestellt, dass Nanopartikel trotz Blockierens von endozytisch relevanten Proteinen in die Zelle aufgenommen werden. Theoretische Grundlagen werden nicht gegeben und der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht aufgeklärt [15, 16].

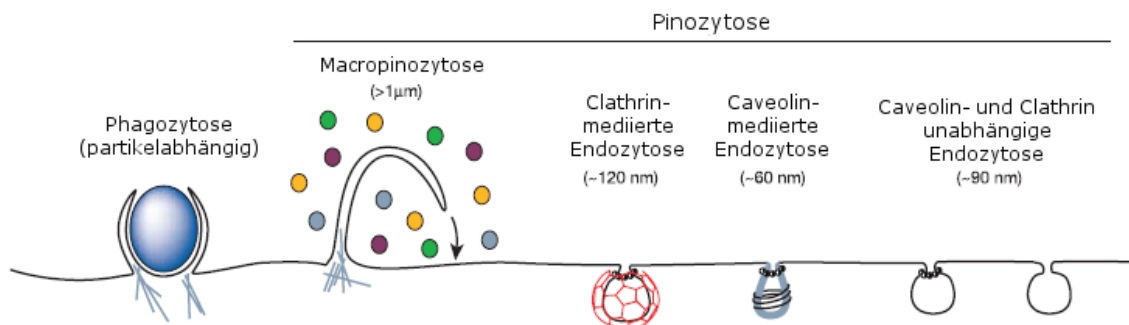


Abbildung 2.11: Verschiedene Aufnahmemechanismen in die Zelle. Die endozytischen Aufnahmewege unterscheiden sich im Bezug auf das endozytische Vesikel, die Natur des Cargos (Liganden, Rezeptoren und Lipide) und den Mechanismus der Vesikelbildung. Angepasst mit Erlaubnis der Nature Publishing Group nach [98].

2.4.2 Interaktion von Nanopartikeln mit Erythrozyten

Wie in Abschnitt 2.1.2 erwähnt, sind Erythrozyten eine der einfachsten menschlichen Zellen und besitzen keinerlei Proteine, die endozytische Aufnahme ermöglichen. Für Mediziner sind die Wechselwirkungen von Erythrozyten mit Nanopartikeln von

großem Interesse, da Nanopartikel als potentielle Wirkstofftransport-Systeme gesehen werden und auch intravenös verabreicht werden sollen. Deshalb existieren viele Studien, die verschiedene Nanopartikel verwenden. Einige wichtige Beispiele werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

600 nm große, mesoporöse Siliciumdioxid-Nanopartikel werden von RBCs aufgenommen (siehe Abbildung 2.12 a)). Andere Größen und Oberflächenmodifizierungen zeigen bestenfalls Anlagerung [37]. Kleine negativ geladene Hydroxylapatit-Nanopartikel (HAP-NPs) bzw. mit Heparin modifizierte HAP-NPs (10-20 nm) zeigen eine Verformung der Zellmembran (siehe Abbildung 2.12 b)), größere HAP-NPs (150-300 nm) keinerlei Interaktion [99]. Polysyrol-Nanopartikel (PS-NPs) verschiedener Größen (100-1000 nm) mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen (Carboxyl-, Amin-, Aldehy-, Polyethylenimin-modifizierung) sind mit den Erythrozyten verknüpft und zeigen unterschiedlich lange Umlaufzeiten im Blut. Es wird jedoch keine Aussage darüber getroffen, ob die Partikel aufgenommen wurden oder an den Zellen haften [100]. Dem widersprechend zeigen andere Publikationen, dass Polysyrol-Nanopartikel bis zu 200 nm von RBCs aufgenommen werden, 1000 nm Partikel jedoch keinerlei Interaktion zeigen [101]. Weitere Publikationen beschäftigen sich mit sehr kleinen Nanopartikeln (1-20 nm), welche die Membran durchdringen [102], Poren schlagen [103] oder das Zytoskelett umordnen oder sogar zerstören [7].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich viele Forschungsgruppen mit der Interaktion von Nanopartikeln mit Erythrozyten beschäftigen, durch unterschiedliche Herangehensweisen jedoch teils widersprüchliche Ergebnisse erhalten.

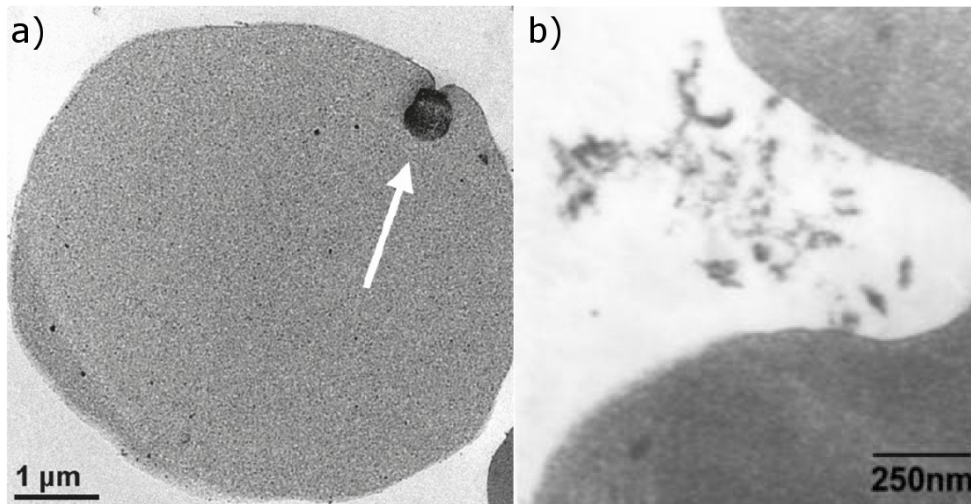


Abbildung 2.12: a) Aufnahme eines mesoporösen, unmodifizierten 600 nm Siliciumdioxid-Nanopartikels in eine RBC. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [37]. b) Verformung der Membran durch 10-20 nm Hydroxylapatit Nanopartikel (ζ -Potential -7,3 respektive -50 mV). Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [99].

2.4.3 Transmembraner Transport in Modellsystemen

Theoretisch

Es ist von großer Bedeutung den Aufnahmemechanismus von Nanopartikeln in Zellen zu verstehen, weshalb das komplexe System *Zellmembran* auf einfache Vesikel reduziert wurde. Deserno et al. [104–106] beschreiben theoretisch die Wechselwirkung zwischen einem kleinen kolloidalen Teilchen und einem unilamellaren Vesikel, welches eine fließende Membran besaß. Bei der einfachen Variationsrechnung wurde nur Adhäsion zwischen Membran und Teilchen sowie die Dehn- und die Biegeenergien berücksichtigt (siehe Abbildung 2.13a)).

Es ergeben sich drei Zustände, wobei die Partikel ungebunden, teilweise eingewickelt oder aufgenommen sind. Im Falle einer Aufnahme muss das Teilchen komplett umhüllt sein, was von dem Verhältnis der Radien und der Oberflächenspannung abhängt.

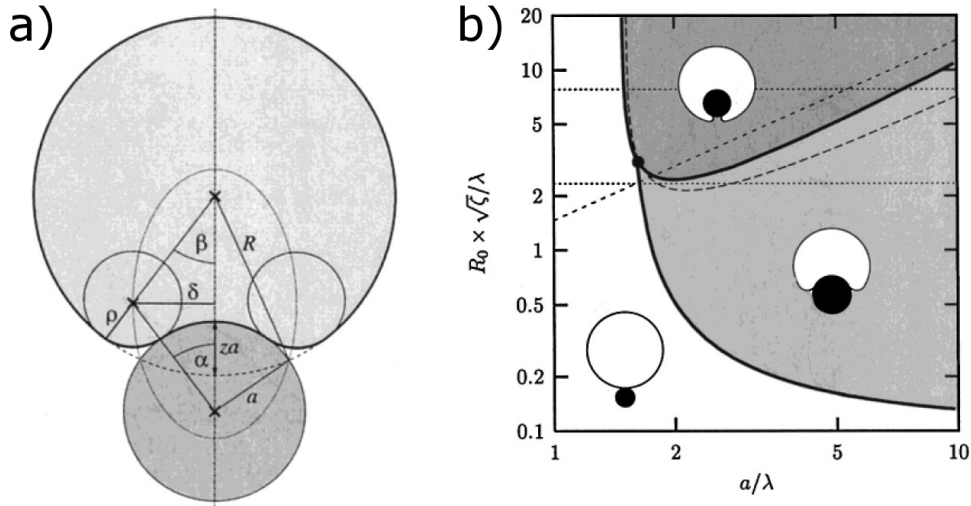


Abbildung 2.13: a) Ein Teilchen des Durchmessers a interagiert mit der Membran eines Vesikels mit dem Durchmesser R und dringt in diese ein, was durch die Eindringtiefe z definiert wird. Die Formung der Membran kann dann durch eine runde Kontaktlinie mit dem Radius ρ beschrieben werden. Wo der Kreis mit dem Radius ρ liegt, wird durch die Parameter β und δ bestimmt. Die gestrichelte Linie spiegelt die Form der Vesikelmembran wieder, wenn der Partikel noch nicht in das Vesikel penetriert ist [104]; b) Phasendiagramm der drei Zustände ungebunden (weiß), teilweise eingewickelt (hellgrau) und aufgenommen (dunkelgrau). Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [104].

Ein schematisches Phasendiagramm der drei Zustände ist in Abbildung 2.13 b) dargestellt. Hierbei ist $R_0\sqrt{\zeta}/\lambda$ gegen a/λ aufgetragen, die wie folgt zusammenhängen:

$$R_0\sqrt{\zeta}/\lambda = \frac{(a/\lambda)}{\sqrt{2 - 4.603a/\lambda^2}} \quad (2.10)$$

Dabei ist a der Radius des Teilchens, R_0 der Radius des Vesikels, ζ das Verhältnis der beiden Materialkonstanten k_{ad} (Adhäsionskonstante) zu k_{ten} (Oberflächenexpansion) und $\lambda = \sqrt{k_c/k_{ad}}$ ein Längenmaßstab mit k_c als Biegesteifheit. Der Verlauf der Internalisierung ist in Abbildung 2.14 a) veranschaulicht.

Aus den theoretischen Betrachtungen ergibt sich für gegebene physikalische Parameter ein optimales Radienverhältnis von Partikel zu Vesikel von 1:6.

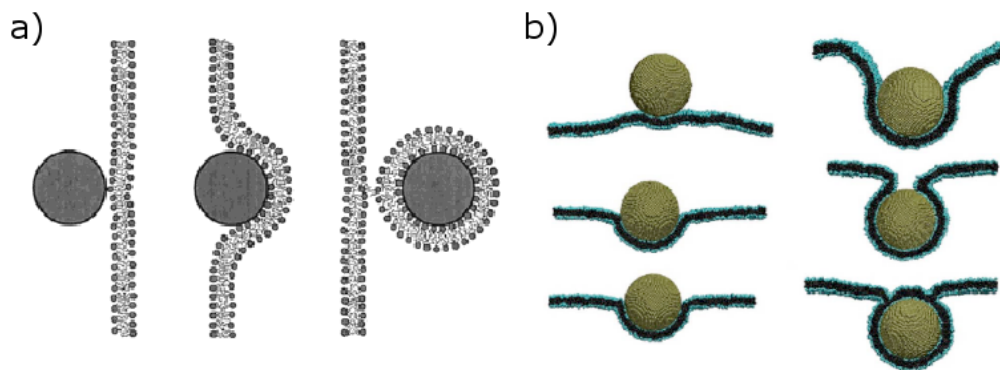


Abbildung 2.14: Schematischer Verlauf von Adhäsion und Umhüllen eines Nanopartikels für die zwei theoretischen Modelle nach a) Deserno [104] und b) Balazs [107]. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society bzw. der AIP Publishing LCC.

In einem anderen theoretischen Ansatz werden die Wechselwirkungen zwischen einem Nanopartikel und einer Doppelschicht mittels dissipativer Partikel-Dynamik (DPD) betrachtet. DPD erfasst die zeitliche Entwicklung eines Mehrkomponentensystems durch numerische Integration der Newton'schen Bewegungsgleichung. Die Köpfe und Ketten der imaginären Moleküle werden zu sogenannten Betten zusammengefasst, wodurch für eine Doppelschicht drei Betten entstehen. Die Kräfte, die auf ein Bett wirken, sind konservative, Zug- und Zufallskräfte. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist, dass das Teilchen eingewickelt wird und sich ein Vesikel bildet, dieses jedoch in der Membran verankert bleibt (siehe Abbildung 2.14 b)) [107].

Weitere theoretische Ansätze führen Monte Carlo-Simulationen von geladenen Nanopartikeln und fluiden Vesikeln durch [108] oder analysieren die passive (nicht endozytotische) Aufnahme von Liganden-besetzten Partikeln in Vesikel mit moleküldynamischen Simulationen [109]. Letztgenannte Publikation berücksichtigt auch anisotrope Partikel (Nanostäbchen) und konnte auch hier eine Aufnahme simulieren. Zum selbigen Ergebnis kommen andere Gruppen über Coarse-grained-Moleküldynamik [110], Monte Carlo-Simulationen [111] oder dissipative Moleküldynamik [112]. Neben dem

Unterschied in der Simulationsmethode werden auch unterschiedliche Aufnahmewege der Nanostäbchen in die Vesikel proklamiert. Yang et al. simulieren unabhängig von der Orientierung eine Aufnahme der Nanostäbchen (siehe Abbildung 2.15) [112].

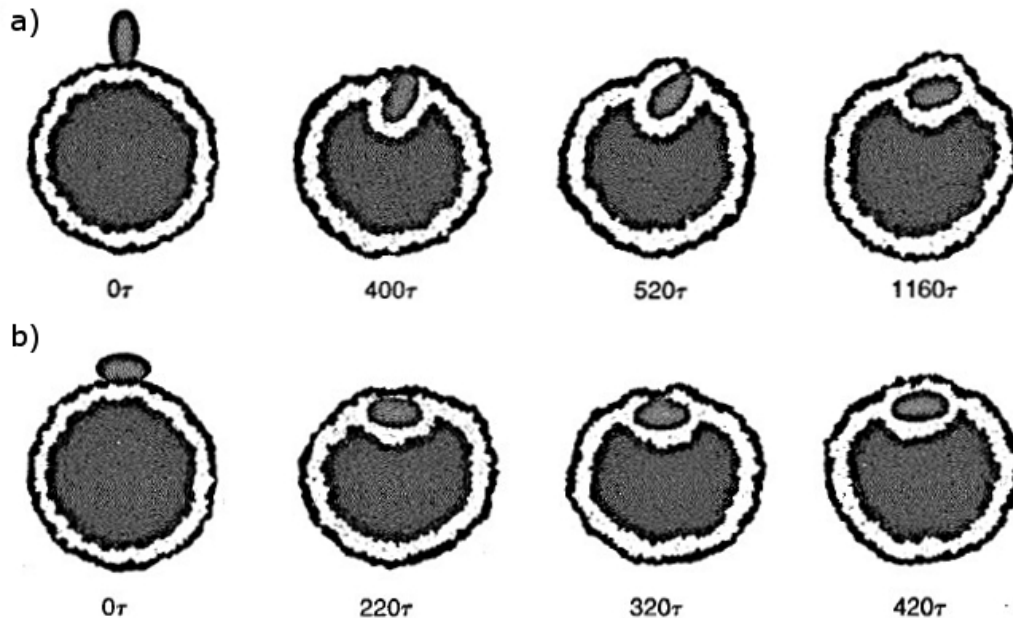


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung des Simulationsverlaufs für vertikal und horizontal andockende Nanostäbchen. Angepasst mit Erlaubnis von CSIRO PUBLISHING nach [112].

Dem entgegen postuliert Huang et al., dass die Nanorods vertikal an das Vesikel andocken und dann über einen *Hinlegen-und-Aufrichten-Mechanismus* internalisiert werden (siehe Abbildung 2.16) [110].

Experimentelle Aufnahme von Nanopartikeln in Zellmodelle

Schon bevor Deserno et al. sich der theoretischen Aufnahme von Nanopartikeln in Vesikel annahmen, wurden von Dietrich et al. theoretisch und praktisch die Adhäsion von Latex-Mikropartikeln an GUVs analysiert [113]. Hierbei wurden GUVs (Radius 10-26 μm) mit einer Laserfalle fixiert und das Verhalten von Latex-Partikeln (Radi-

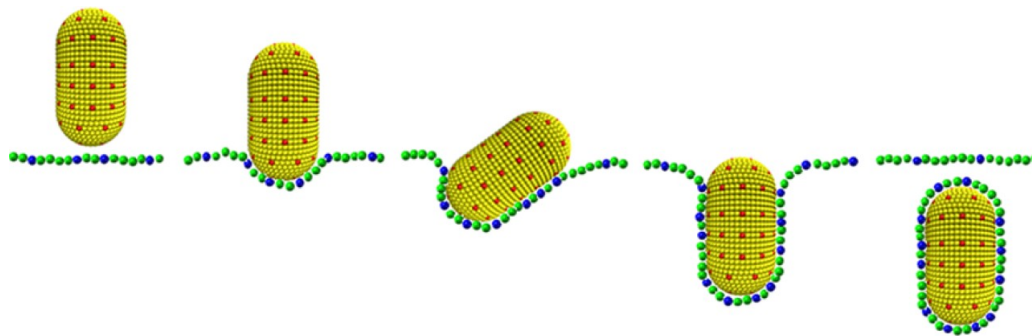


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung des Simulationsverlaufes für die Aufnahme von Nanorods in Vesikel. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [110].

us 6,85 -9,00 μm) beobachtet. Die Partikel wurden fast komplett von der Membran ummantelt, eine Aufnahme konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Etwa zehn Jahre später fand dieses Thema wieder experimentelle Beachtung und einige Gruppen führten Experimente mit GUVs durch.

Liu et al. untersuchten das Verhalten von Poly(*N*-isopropylacrylamid)-Mikrogelen (Durchmesser 2 μm) mit DPPC-GUVs (Durchmesser 10 - 30 μm). Dabei zeigten Mikrogele unterhalb der kritischen Lösungstemperatur (LCST) keine Interaktionen mit den GUVs, was auf die elektrostatische Abstoßung zurückgeführt wurde. Lipogele, die durch Zugabe von Lipiden auf Mikrogele entstanden, adsorbierten dementsgegen auf den GUVs und wurden oberhalb der LCST sogar in der Lipidmembran verankert. Hier wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen durch die Lipidschicht weniger (unterhalb der LCST) oder mehr (oberhalb der LCST) abgeschirmt. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2.17 zu sehen [114].

Forscher um Beales untersuchten den Einfluss der Größe auf die Interaktion von Siliciumdioxid-Partikeln (18, 78 und 182 nm Durchmesser) mit DOPC-GUVs. Die 18 nm großen Partikel adsorbierten an der GUV-Membran, wodurch die vorher fluide Membran rigide wurde. Die größeren Partikel wurden von der Membran umhüllt, was

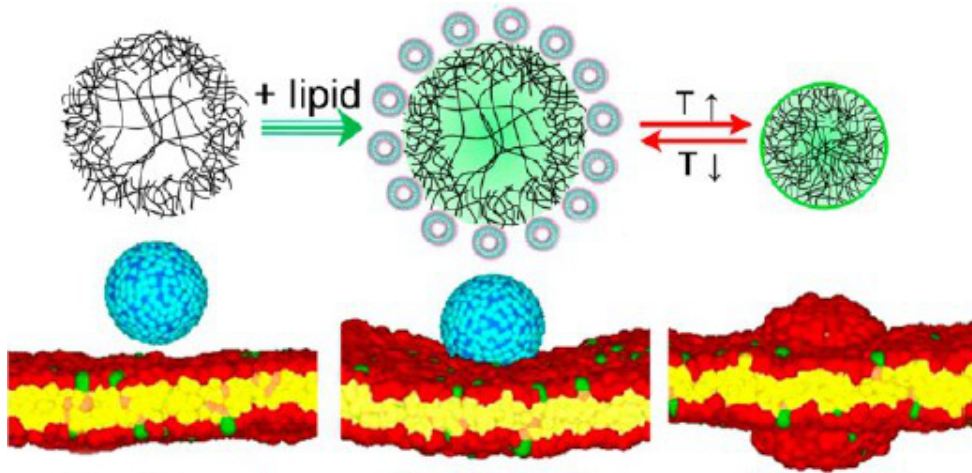


Abbildung 2.17: Steuerung der Interaktion von Poly(N-isopropylacrylamid)-Mikrogelen, indem die Wechselwirkungen zwischen GUVs und Partikel durch Lipidzugabe und Temperaturänderung eingestellt werden. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [114].

teilweise zum Kollaps des GUVs führte (siehe Abbildung 2.18) [115]. Der Prozess des Einwickelns von Partikeln wurde ebenfalls von Tahata et al. beobachtet, welche die Aufnahme von oberflächenmodifizierten Nanocontainern in GUVs untersuchten [116].

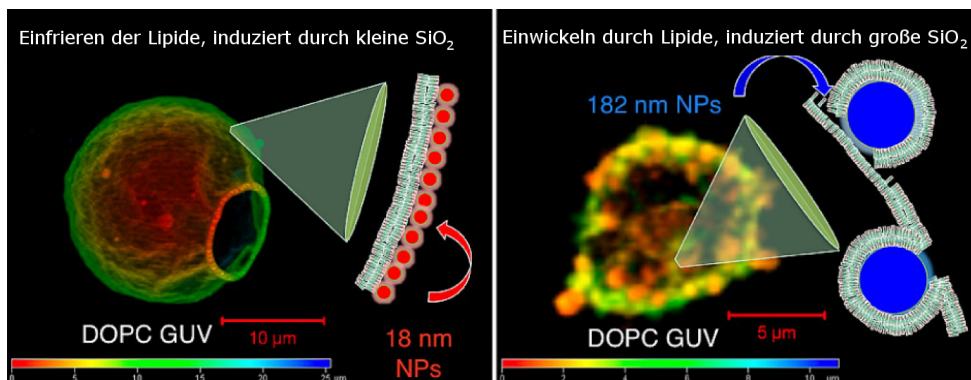


Abbildung 2.18: Größenabhängiger Einfluss auf das Verhalten der Membran in Anwesenheit von Siliciumdioxid-Nanopartikeln. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [115].

Andere Gruppen studierten die Interaktionen zwischen kleineren Partikeln und Vesikeln oder planaren Membranen. Auf adsorbierte Siliciumdioxid-Partikel wird eine DPMC-Lipidmembran gelegt. Rasterkraftmikroskopie zeigte, dass Partikel kleiner

als 22 nm die Membran zerstörten und Poren bildeten, während Partikel größer als 22 nm von der Membran umhüllt wurden (siehe Abbildung 2.19) [103].

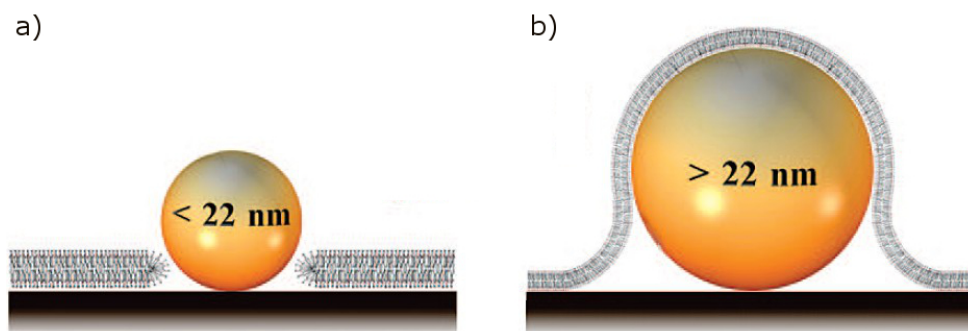


Abbildung 2.19: Interaktionen von Siliciumdioxid-Partikeln mit darüber gelegten DMPC-Membranen zeigen, dass a) kleine Partikel Poren bilden und b) größere Partikel von der Membran umhüllt werden. Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [103].

Weitere Publikationen zeigten, dass Amidin-funktionalisierte Polystyrol-Nanopartikel (20 nm Durchmesser) Poren in die Membran von GUVs (DPPC, DOPC, Cholesteroll 1:1:1) schlugen [70]. Andere Experimentatoren mischten DOPC-GUVs mit unterschiedlich funktionalisierten Gold- bzw. Titanoxid-Nanopartikeln (10 nm Durchmesser) und führten die beobachtete Porenformation auf elektrostatische Wechselwirkungen zurück [117].

Jaskiewicz et al. führten Polymersome als minimales Zellmodell zur Aufnahme von Nanopartikeln ein. Dabei wurden Polymersome aus dem Blockcopolymer PDMS-*b*-PMOXA hergestellt und charakterisiert [81]. Durch eine Kombination verschiedener Methoden (PCS, FCS und Cryo-TEM) wurde die Aufnahme von Polystyrol (32 nm Durchmesser) und Siliciumdioxid-Nanopartikeln (28 nm Durchmesser) in Polymersome mit einem Radius von 224 nm gezeigt [118].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass große Siliciumdioxid-NPs (50 nm Durchmesser) einzeln aufgenommen wurden und sich kleine Siliciumdioxid-NPs (28 nm Durchmesser)

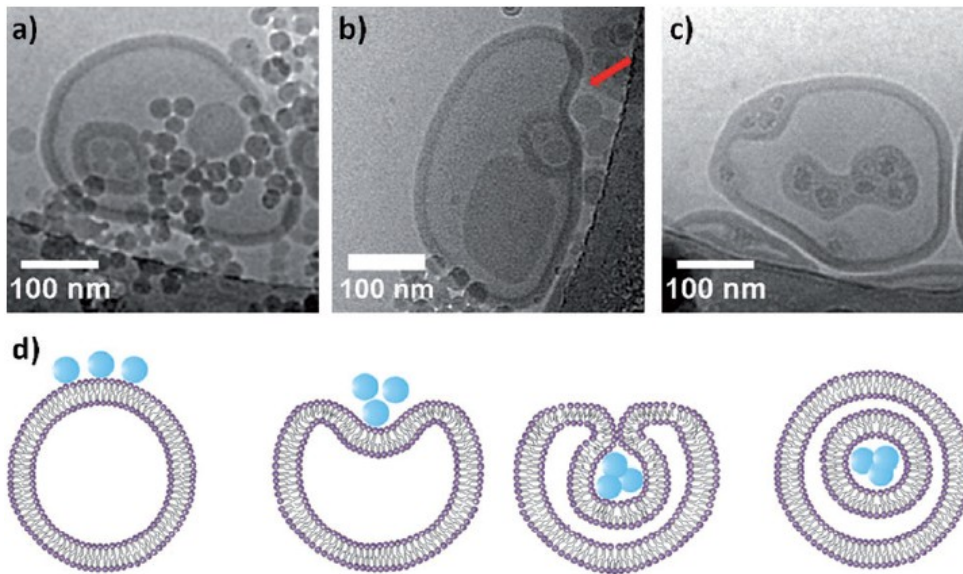


Abbildung 2.20: Cryo-TEM-Abbildung von Nanopartikelaufnahme (Polystyrol- (a,b) und Siliciumdioxid-NP (c)) in Polymersome und d) schematische Darstellung der NP-Aufnahme. Angepasst mit Erlaubnis von Wiley-VHC nach [118].

zusammen lagerten, bis sie eine definierte Größe erreicht hatten und dann als Gruppe aufgenommen wurden (siehe Abbildung 2.21). Außerdem ist die Aufnahme von Nanopartikeln in Polymersome konzentrationsabhängig [119].

In der entsprechenden Dissertation werden folgende offene Fragen präsentiert [78]:

- Welchen Einfluss hat das Variieren der Membrandicke?
- Können Membranproteine in die Polymersome eingelagert werden? Dies würde das System der realen Membran näher bringen. Der Einfluss der Proteine auf die Dynamik und deren mechanisches Verhalten ist von großem Interesse.
- Können durch Modifizieren der Polymersom-Oberfläche weitere Informationen über den Aufnahmemechanismus erhalten werden?
- Können die Polymersome so vergrößert werden, dass sie realen Zellen näher kommen und der Einfluss der Krümmung analysiert werden kann?
- Welchen Einfluss hat die Partikelform auf die Aufnahme in Polymersome?

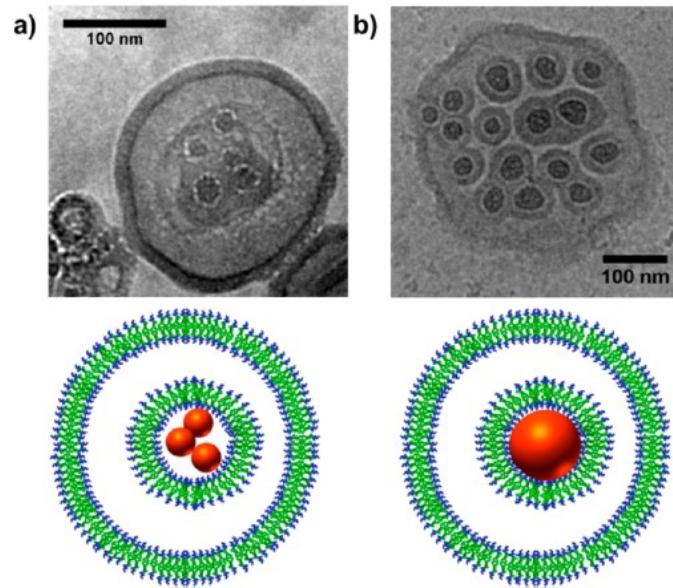


Abbildung 2.21: Cryo-TEM-Abbildung und schematische Darstellung der Nanopartikelaufnahme von Siliciumdioxid-NPs a) in Gruppen (für 28 nm Durchmesser) und b) einzeln (für 50 nm Durchmesser). Angepasst mit Erlaubnis der American Chemical Society nach [119].

In der vorliegenden Arbeit wurden einige dieser Fragestellungen behandelt.

3.1 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden alle verwendeten Methoden kurz theoretisch dargestellt. Nach einem einführenden Abschnitt, der sich mit Mikroskopie im allgemeinen beschäftigt, wird auf Konfokal-, Transmissionselektronen- und Rasterkraftmikroskopie eingegangen und mit Photokorrelationsspektroskopie abgeschlossen.

Der kleinste Abstand d_{min} , der mit einem Lichtmikroskop aufgelöst werden kann, ist nach dem Raylight-Kriterium:

$$d_{min} = \frac{0,61\lambda}{NA_{obj}} = \frac{0,61\lambda}{n_I \sin \alpha} \quad (3.1)$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts, NA_{obj} die numerische Apparatur des Objektivs, n_I der Brechungsindex des Immersionsmediums und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist. Mit einem normalen Lichtmikroskop kann somit eine Auflösung von einigen 100 nm erhalten werden [120].

Es existiert jedoch eine Vielzahl an Mikroskopiearten, welche dem normalen Lichtmikroskop hinsichtlich Auflösung und Informationsgehalt überlegen sind. Zwei Beispiele

sind die Konfokalmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden.

3.1.1 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Die Erfindung der konfokalen Laser-Rastermikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) geht auf ein Patent von Marvin Minsky 1957 zurück. Es dauerte jedoch drei Jahrzehnte, bis die CLSM in den späten 80er Jahren zu einer Standardmethode wurde. Der Aufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Ein Laser trifft auf einen dichromatischen Spiegel und wird auf die fluoreszenzmarkierte Probe fokussiert. Das fluoreszierende Licht passiert den dichromatischen Spiegel und wird von einem Photomultiplier detektiert. Durch Bewegung des dichromatischen Spiegels kann die Probe in z-Richtung abgescannt werden. Am Computer können die einzeln abgebildeten Ebenen zu einem 3D-Bild zusammengefügt werden.

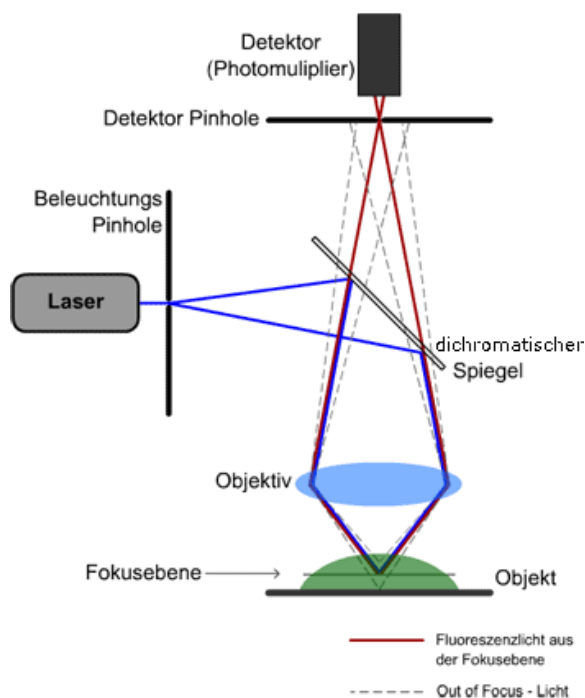


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Laser-Rastermikroskops [121].

Die laterale Auflösung d_{min} wurde weiter oben in Formel 3.1 schon eingeführt, die axiale Auflösung ist definiert als:

$$z_{min} = \frac{2\lambda n_M}{(NA_{obj})^2} \quad (3.2)$$

wobei n_M der Brechungsindex des analysierten Mediums ist. Es kann eine axiale Auflösung unter einem Mikrometer erreicht werden [122].

3.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde von Ruska und Knoll das erste Transmissionselektronenmikroskop gebaut. Bei dieser Art von Mikroskopen werden Elektronen auf eine Probe geschossen und das Streubild analysiert. Die De-Broglie-Gleichung liefert die theoretische Auflösung:

$$d_{min,TEM} = \frac{1,22}{E^{1/2}} \quad (3.3)$$

wobei E die Energie der Elektronen in eV ist. Für Elektronen mit 100 keV erhält man eine Auflösung von ca. 4 pm. Die Auflösung in der modernen Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) beträgt 0,5 Å. Somit ist man noch weit vom *perfekten* Transmissionselektronenmikroskop entfernt. Trotzdem ist die TEM die Methode der Wahl, wenn es darum geht Proben hochauflösend zu analysieren.

Aufbau und Funktionsweise eines Transmissionselektronenmikroskops

Der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops ist analog zu dem eines normalen Lichtmikroskops, bestehend aus Lichtquelle, Linsensystem, Probe und Detektor. In der TEM werden Elektronen von einer Quelle (Wolframdraht, LaB_6 -Kristall oder Feldemissionskathode) emittiert, im Hochvakuum mit einer Spannung von bis zu 400 keV beschleunigt und durch ein Linsensystem, bestehend aus elektromagne-

tischen Spulen, auf die Probe fokussiert. Die von der Probe gestreuten Elektronen werden wiederum mit elektromagnetischen Linsen in die Bildebene fokussiert und mit einer CCD-Kamera aufgenommen (siehe Abbildung 3.2).

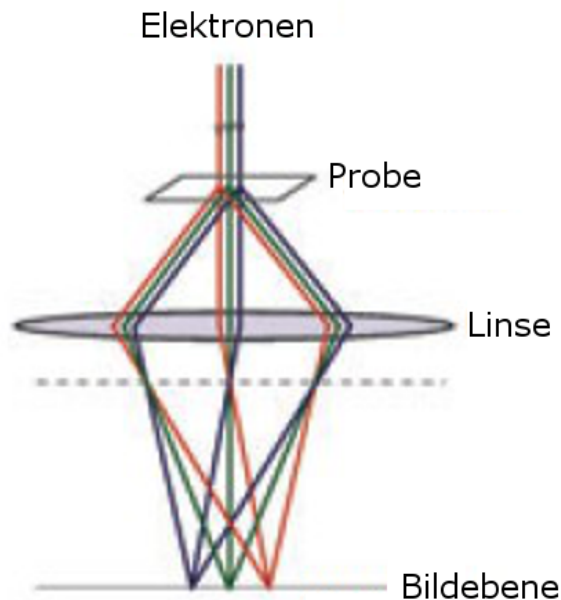


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Transmissionselektronenmikroskops. Angepasst mit Erlaubnis von Springer US nach [120].

Ein Hauptproblem der TEM ist der Schaden, der von den Elektronen an der Probe verursacht wird. Wenn Elektronen auf die Probe treffen, können diese entweder transmittieren, elastisch oder unelastisch gestreut werden. Dabei ist der kritische Punkt die unelastische Streuung, da hierbei die Energie der Elektronen auf die Probe übertragen wird, was dazu führen kann, dass die Probe beschädigt wird, indem zum Beispiel Bindungen aufgebrochen werden. Um diesen Effekt zu minimieren, kann entweder mit geringerer Elektronendosis oder bei kryogenen Temperaturen gearbeitet werden. Letzteres hat den Vorteil, dass bei höheren Elektronendosen gearbeitet werden kann, wodurch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wird [123,124].

Cryo-TEM

Proben, die mit der TEM analysiert werden sollen, müssen im Hochvakuum stabil sein, was bei vielen biologischen Proben nicht gegeben ist. 1974 veröffentlichten Taylor und Glaeser Experimente zur Elektronenbeugung an gefrorenen Proteinkristallen [125]. Dies kann als Grundlage der Cryo-TEM gesehen werden. Die Idee ist es, eine Probe durch Einfrieren zu fixieren, um diese dann bei cryogenen Temperaturen (unter Kühlen mit flüssigem Stickstoff) im Transmissionselektronenmikroskop zu analysieren [123]. Hierbei wird heutzutage meist mit einem kommerziell erhältlichen Gerät, wie zum Beispiel dem Vitrobot (FEI), gearbeitet. In einer abgeschlossenen Kammer wird ein Tropfen der zu analysierenden Lösung auf ein Trägernetz aufgetragen und *geblottet* (Abziehen von Flüssigkeit durch ein Filterpapier). Dabei ist es notwendig, bei hoher Luftfeuchtigkeit zu arbeiten, damit der durch das *Blotten* entstandene dünne Film nicht verdunstet. Die Probe wird anschließend in flüssiges Ethanol getaucht, wodurch sie vitrifiziert und somit zugänglich für TEM-Messungen wird. Ein weiterer Vorteil der Cryo-TEM ist es, Proben in ihrer natürlichen Umgebung, zum Beispiel in Lösung, zu analysieren.

3.1.3 Rasterkraftmikroskopie

Die 1986 von Binnig, Quate und Gerber entwickelte Rasterkraftmikroskopie (englisch *Atomic Force Microscopy* (AFM)) ist eine Klasse der Rastersondenmikroskopie. Es gelang damit erstmals die Oberfläche einer nichtleitenden Probe abzubilden [126]. Heute ist die AFM eine Standardmethode zur Abbildung, Charakterisierung und Modifizierung von Materialien im Nanometerbereich. Dabei sind heute den Versuchsbedingungen, wie Medium, Temperatur etc. kaum Grenzen gesetzt.

Aufbau und Funktionsweise

Das Rasterkraftmikroskop besteht aus einem Federbalken (Cantilever) mit einer scharfen Spitze, welche als Sonde zur Erfassung der Textur von Oberflächen dient. Der Cantilever wird durch ein Piezo-Element zeilenweise über die Probe geführt. Um die vertikale Auslenkung des Cantilevers zu detektieren, wird der auf der Oberseite des Cantilevers reflektierte Strahl eines Lasers mit einem Fotodetektor erfasst. Dabei erfolgt aus der Signaländerung die Höhendetektion (Abbildung 3.3).

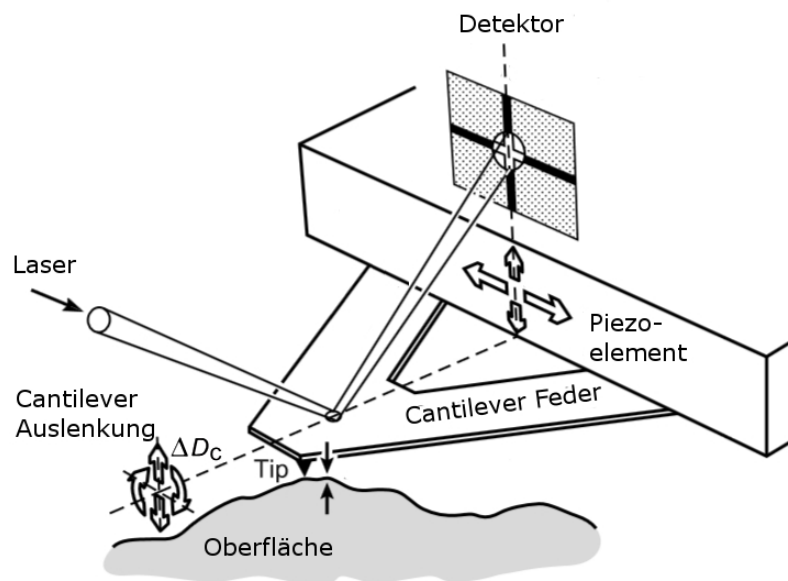


Abbildung 3.3: Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Topologie einer Oberfläche durch Detektieren der Kräfte, die die Spitze beim zeilenweisen Abtasten erfährt, abgebildet. Der Tip ist an der Cantileverfeder befestigt, dessen Auslenkung ΔD_c durch Reflexion eines Lasers auf seiner Oberfläche detektiert wird. Angepasst mit Erlaubnis von Wiley-VCH nach [39].

Bildgebung

Es existieren verschiedene Modi, mit denen AFM-Abbildungen erstellt werden können. Die wichtigsten sind die folgenden: *contact-*, *non-contact-* und *tapping mode*. Der erstgenannte Modus, der *contact mode*, ist eine statische Methode, bei der die

Auslenkung des Cantilevers direkt detektiert wird. Die anderen beiden Modi sind dynamische Methoden. Hier wird der Cantilever nahe seiner Resonanzfrequenz:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_c}{m_0}} \quad (3.4)$$

angeregt, wobei m_0 die effektive Masse des Cantilevers ist. Die Bewegung kann mit der nicht-linearen Differentialgleichung zweiter Ordnung für einen gedämpften harmonischen Oszillator beschrieben werden:

$$m_0 \ddot{z} + k_c z + \frac{m 2\pi f_0}{Q} \dot{z} = F_{ts} + F_0 \cos(\omega t) \quad (3.5)$$

F_0 und ω sind die Amplitude und Kreisfrequenz der treibenden Kraft. Q ist der Gütefaktor und F_{ts} die Kraft zwischen Spitze und Oberfläche. Sowohl Amplitude, als auch Kreisfrequenz werden durch F_{ts} verändert und können daher als Regelgröße verwendet werden, um die Topografie abzubilden.

Kraft-Abstands-Kurven

Die Kraft F zwischen der Probe und dem Cantilever verursacht eine Auslenkung z welche in guter Näherung mit dem Hook'schen Gesetz beschrieben werden kann:

$$F = -k_c z \quad (3.6)$$

Hierbei ist k_c die Federkonstante. Es existieren Kräfte mit unterschiedlichen Abstandsabhängigkeiten. In Abwesenheit von externen Kräften sind die Van-der-Waals-Kraft, Adhäsion und Kapillarkräfte die bestimmenden Faktoren. Zusammengesetzt ergibt sich ein Bereich mit attraktiven Wechselwirkungen und ein Bereich mit repulsiven Wechselwirkungen (siehe Abbildung 3.4).

Neben dem Abbilden können mit Rasterkraftmikroskopen auch Kraft-Abstands-Kurven

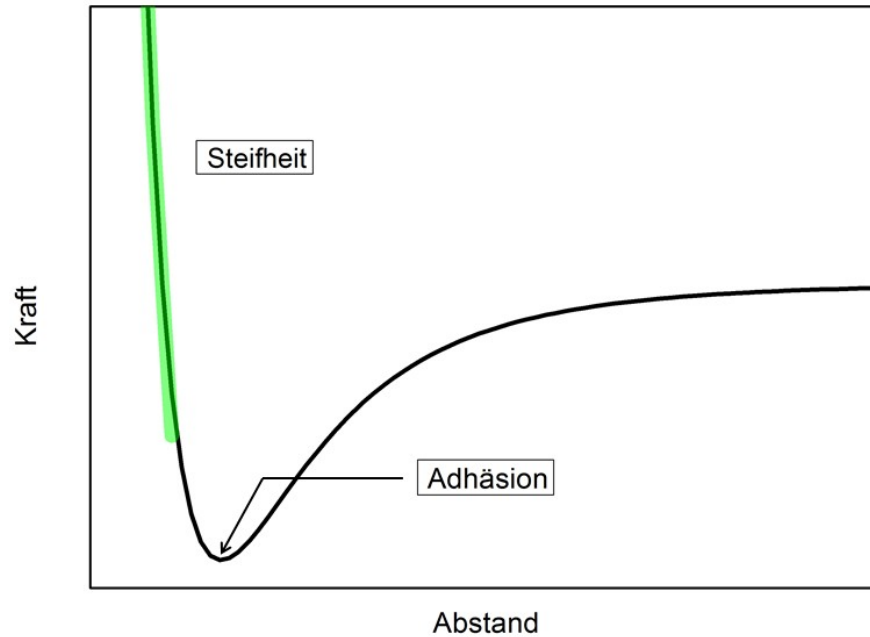


Abbildung 3.4: Lennard-Jones-Potential, welches die verschiedenen Wechselwirkungsbereiche zweier sich nähernder Atome beschreibt.

(englisch *force distance curve*, FD-Kurven) aufgenommen werden, aus denen Größen wie Adhäsion, Steifheit oder Dissipation gewonnen werden können. Der Verlauf eines solchen Experimentes ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Quantitative Bildgebung

Eine neue Methode ist die quantitative Bildgebung (englisch *quantitative imaging*, QI), bei der zugleich die Topographie einer Probe abgebildet und in jedem Messpunkt eine Kraft-Abstands-Kurve aufgenommen wird. Hierbei wird die zu analysierende Fläche in Pixel unterteilt. Der Cantilever wird, wie bei den FD-Messungen, aus definierter Entfernung an die Probe angenähert und eine FD-Kurve aufgenommen. Aus dem zurückgelegten Weg zwischen Ausgangszustand und Berühren der Oberfläche wird die Topographie erstellt. Da der Cantilever beim QI nicht über die Probe gezogen wird, ist die mechanische Belastung der Probe verringert und eine Verschiebung

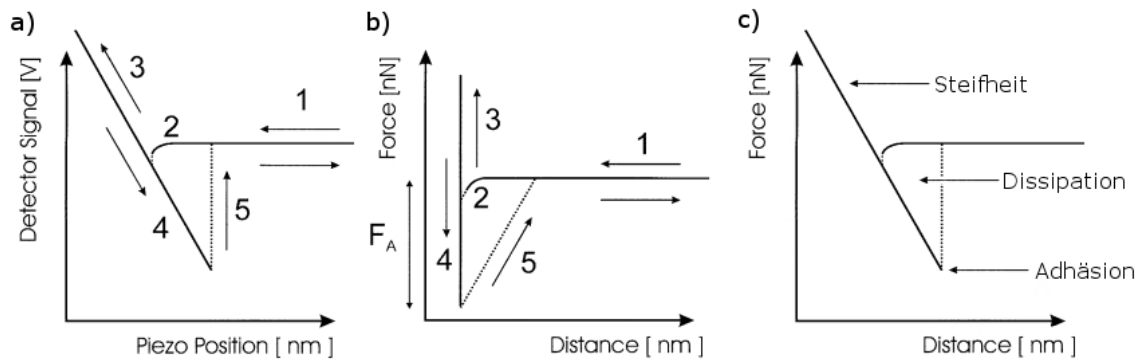


Abbildung 3.5: a) Schematische Darstellung einer Detektorsignal-Piezo-position-Kurve. Wenn der Cantilever weit von der Oberfläche entfernt ist, ist keine Auslenkung detektierbar (1). Wenn sich der Cantilever der Oberfläche nähert, wird dieser durch die wirkenden Kräfte ausgelenkt (2). Sobald die attraktiven Wechselwirkungen größer werden als die Federkonstante des Cantilevers, springt die Spitze in Kontakt mit der Probe. Von da an bewegen sich Spitze und Probe parallel. Die entstehende Gerade (3) entspricht der *constant compliance*-Region. Beim Zurückziehen haftet die Spitze normalerweise an der Oberfläche und verursacht eine starke Auslenkung des Cantilevers (4). Gegebenenfalls ist die Auslenkung größer als die Adhäsion und der Cantilever wird irgendwann von der Oberfläche abreißen und in den Ausgangszustand zurückkehren (5). b) Ist die entsprechende Kraft-Abstands-Kurve, die nach Kalibrieren erhalten wird. c) Wird eine FD-Analyse auf weichen Proben durchgeführt, wird eine Referenz-Kraft-Abstandskurve auf hartem Untergrund genommen und diese normiert. Die FD-Kurve auf der weichen Probe wird identisch kalibriert und es entsteht die gezeigte Kurve, aus der Steifheit, Dissipation und Adhäsion ausgelesen werden können. Angepasst mit Erlaubnis von Wiley-VCH nach [127].

leicht beweglicher Proben verhindert. Aus einer QI-Datei kann sowohl ein Gesamtbild der Probe (Topographie), als auch lokale Eigenschaften (aus FD-Kurven) gewonnen werden.

Colloidal Probe-Technik

Die *Colloidal Probe*-Technik wurde 1991 parallel von Ducker und Butt eingeführt. Dabei wurde ein kolloidaler Siliciumdioxid-, bzw. Glas-Partikel auf das Ende eines Cantilevers ohne Spitze geklebt. Der so modifizierte Cantilever wurde in der Rasterkraftmikroskopie eingesetzt und zeigt folgende Vorteile [20, 127–129]:

- Die Kraft kann durch die definierte Form des Kolloids quantitativ analysiert werden;
- Die absolute Kraft ist höher, wodurch die Messungen sensitiver werden;
- Durch Ankleben chemisch unterschiedlich modifizierter Partikel kann eine hohe Bandbreite an Wechselwirkungen studiert werden;
- Hydrodynamische Kraftmessungen werden möglich.

Die AFM zur Charakterisierung von Polymersomen

Ein Anwendungsgebiet der AFM ist die physikalische Charakterisierung von Proben. So ist es auch möglich, die Steifheit, Elastizitäts- und Biegemodul einzelner Vesikel zu bestimmen [81]. Adsorbierte Vesikel werden mittels quantitativer Bildgebung analysiert. Aus der QI-Datei wird die Kraft-Abstands-Kurve auf dem höchsten Punkt eines Vesikels extrahiert und im Bereich der repulsiven Wechselwirkungen linear gefittet, wodurch die Steifheit der Membran κ_{mem} erhalten wird (siehe Abbildung 3.5). Unter Annahme von Punktlast, Verformung der Membran in der Größenordnung der Membrandicke h , $h \ll R$ (R ist der Krümmungsradius des Polymervesikels) und Erhaltung des flüssigen Kerns kann die Dünnschichttheorie angenommen werden [130, 131]. Der Elastizitätsmodul E ergibt sich somit zu:

$$E = \frac{4\kappa_{mem}h^2}{R\sqrt{3(1-\nu^2)}} \quad (3.7)$$

wobei h die Membrandicke und ν das Poisson-Verhältnis ist, welches auf 0,5 gesetzt wird [130, 132]. R ist der Krümmungsradius und ist definiert als:

$$R = \frac{0,25W^2 + H^2}{2H} \quad (3.8)$$

wobei W die Breite und H die Höhe des gespreiteten Vesikels ist. Aus dem Elastizi-

tätsmodul E kann der Biegemodul κ_{bend} berechnet werden [83, 130, 133]:

$$\kappa_{\text{bend}} = \frac{Eh^3}{12(1 - \nu^2)} \quad (3.9)$$

3.1.4 Lichtstreuung

Lichtstreuung, auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, ist eine nicht invasive Technik zur Charakterisierung von Partikeln, Makromolekülen und deren Aggregaten in Lösung. Wenn Licht auf ein Streuzentrum trifft, wird ein oszillierender Dipol (Hertzscher Dipol) induziert, welcher selbst Licht abstrahlt. Die Frequenzänderung, die winkelabhängige Verteilung und die Intensität werden durch Größe und Form des Streuzentrums sowie durch die molekularen Wechselwirkungen im Streuzentrum bestimmt [134–140].

Ein typischer Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Dabei wird das Licht eines Lasers durch einen Polarisator vertikal polarisiert, welches dann auf die Probe trifft. Das gestreute Licht passiert den Analysator, der entweder in vertikaler (VV, polarisierte PCS) oder horizontaler (VH, depolarisierte PCS) Position stehen kann.

Aus dem Experiment wird die normalisierte Lichtstreuintensität ($I(q, t)$) Autokorrelationsfunktion:

$$G(q, t) = \frac{\langle I(q, t)I(q) \rangle}{|I(q)|^2} \quad (3.10)$$

über definierte Zeiten t bei verschiedenen Streuwellenvektoren:

$$q = (4\pi n/\lambda) \sin(\Theta/2) \quad (3.11)$$

gewonnen, wobei n der Brechungsindex der Lösung und Θ der Streuwinkel ist. Aus

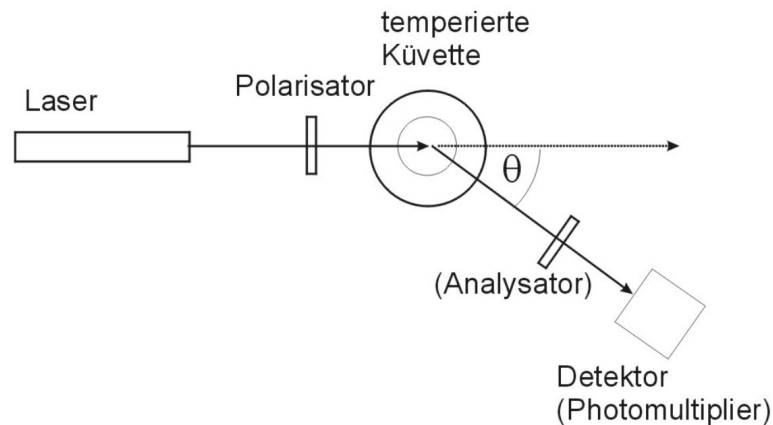


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau eines Lichtstreuapparates [141].

der Autokorrelationsfunktion kann durch exponentiellen Fit die Abklingzeit $\Gamma(q)$ extrahiert werden. Sphärische, isotrope Partikel zeigen in VV ein Signal, in VH jedoch nicht. Die Abklingzeit Γ_{VV} lässt direkt auf die Diffusion der Partikel schließen. Anisotrope Partikel zeigen sowohl in VV, als auch in VH ein Signal. Die Abklingzeit Γ_{VH} lässt Rückschlüsse auf die Diffusion und die Rotation der Teilchen zu. Liegt ein System mit nur einem Teilchen vor, kann monoexponentiell gefittet werden. Je größer das Teilchen ist, desto weiter ist die Abklingkurve nach rechts verschoben. Bei zwei Teilchen muss biexponentiell gefittet werden, sofern beide Prozesse unterscheidbar sind [142].

3.2 Materialien

In diesem Unterkapitel werden alle verwendeten Chemikalien und Partikel aufgelistet.

3.2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien mit den entsprechenden Abkürzungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 3.1: Tabelle aller verwendeten Chemikalien und deren Abkürzung, Strukturformel und Hersteller.

Chemikalie	Abkürzung	Strukturformel	Hersteller
1,4-Diethylendiamin	Piperazin	$C_4H_{10}N_2$	Aldrich
2-Allyloxyethanol	-	$C_5H_{10}O_2$	Sigma-Aldrich
2-Methyl-2-oxazoline	MOXA	C_4H_7NO	Aldrich
3-Mercaptopropyl- trimethoxysilan 95 %	-	$C_6H_{16}O_3SiS$	Sigma-Aldrich
11-Mercaptoundecansäure	MUA	$C_{11}H_{22}O_2S$	Sigma-Aldrich
Aktivkohle	-		Acros
Calciumhydrid	-	CaH_2	Fluka
CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain	-	-	liefetechnologies
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	$C_{19}H_{42}BrN$	Sigma-Aldrich
Chloroform	-	$CHCl_3$	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose > 99,5 %	-	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich
Dimethylchlorsilan	-	C_2H_7ClSi	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid	DMF	C_3H_7NO	Sigma-Aldrich
Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS++	-	Sigma-Aldrich
Ethanol (puris)	EtOH	C_2H_6O	Sigma-Aldrich
Hexafluoro-2-propanol	HFIP	$C_3H_2F_6O$	Sigma-Aldrich
Hexamethylcyclotrisiloxane 98%	-	$C_6H_{18}IO_3Si_3$	Sigma-Aldrich
Lecithin aus Eiweiß	-	-	serva
Methanol	MeOH	CH_4O	VWR
Methanol (dry)	MeOH	CH_4O	Acros
Methylenchlorid (dry)	DCM	CH_2Cl_2	Sigma-Aldrich

KAPITEL 3. METHODEN UND MATERIALIEN

Tabelle 3.1: Tabelle aller verwendeten Chemikalien und deren Abkürzung, Strukturformel und Hersteller.

Chemikalie	Abkürzung	Strukturformel	Hersteller
Mineralöl, leicht (M3516)	-	-	Sigma-Aldrich
Molekularsieb 0,4nm	-	-	Riedel-de Haen
n-Butyllithium	n-BuLi	C_4H_9Li	Sigma-Aldrich
n-Decan	-	$C_{10}H_{22}$	Roth
n-Hexan wasserfrei	-	C_6H_{14}	Merck
N-Methyl-2-pyrrolidon	NMP	C_5H_9NO	Sigma-Aldrich
Natronlauge 1M	-	NaOH	Merck
Natrumcitrat	Citrat	$C_6H_7O_7Na$	Sigma-Aldrich
Natriumlaurylsulfat	SDS	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	-	Sigma-Aldrich
Platinum(0)-1,3 divinyl-1,1,3,3- tetramethyldisiloxane complex solution	Karstedt Katalysator	$C_8H_{18}OSi_2Pt$	Sigma-Aldrich
Polydiallyldimethylammo- niumchlorid	PolyDADMAC	-	Sigma Aldrich
Poly(ethylenglycol) 2-mer- captoethyl Ether Essig- säure $\bar{M}_n = 5000$ g/mol	PEG5000	-	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium	-	-	Sigma-Aldrich
Salzsäure 1M	-	HCl	Merck
Tetrahydrofuran	THF	C_4H_8O	Sigma-Aldrich
Toluol	-	C_7H_8	Sigma-Aldrich
Toluol (dry)	-	C_7H_8	Sigma-Aldrich
Triethylamin	TEA	$C_6H_{15}N$	Acros

Tabelle 3.1: Tabelle aller verwendeten Chemikalien und deren Abkürzung, Strukturformel und Hersteller.

Chemikalie	Abkürzung	Strukturformel	Hersteller
Trifluoromethanesulfonic anhydride	TfSA	$C_2F_6O_5S_2$	Aldrich
Ultra pure water	MilliQ-Wasser	H_2O	Millipore

3.2.2 Partikel

Sphärische Partikel

Alle gekauften oder bereit gestellten sphärischen Partikel sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Auflistung aller verwendeten Partikel inklusive Material, Durchmesser D , Oberflächenmodifizierung, Hersteller, Angabe ob Fluoreszenzmarkierung F vorlag und Konzentration in mg/ml.

Material	D / nm	Oberfläche	Hersteller	F	mg/ml
Gold	41	PEG, Citrat, CTAB	S. Harms, nach [143]	-	
	44	Citrat	S. Harms, nach [143]	-	
	1000-3000	plain	Alfa Aeser	-	
SiO ₂	1000	plain, NH ₂	Kisker	✓	50
	1000	AHAPS	Ch. Goroncy, nach [144]	✓	16
PS	1000	plain, COOH, NH ₂	Kisker	✓	25

Nanostäbchen

Alle gekauften Gold-Nanostäbchen sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Auflistung aller verwendeten Gold-Nanostäbchen (Fa. Nanoseedz (Hong Kong)) inklusive Wellenlänge λ , Breite B , Länge L und Seitenverhältnis AR.

λ / nm /	B / nm	L / nm	AR
700	$68,2 \pm 10$	$23,3 \pm 4,5$	2,9
750	$73,7 \pm 8,3$	$22,9 \pm 2,8$	3,2
780	$63,7 \pm 9,6$	$16,8 \pm 2,8$	3,8
808	$67,1 \pm 8,6$	$17,6 \pm 2,8$	3,8
850	$71,4 \pm 8,8$	$17,0 \pm 2,2$	4,2

In diesem Kapitel werden die experimentell durchgeführten Arbeiten dargestellt. Zunächst wird auf die Synthese des Blockcopolymers eingegangen, dann wird allgemein die Herstellung der im weiteren Verlauf verwendeten Lösungen beschrieben. Abschließend wird ein Überblick über die Probenpräparation für die AFM und die TEM gegeben.

4.1 Synthese des Block-Copolymers

Egli et al. [145] publizierten die Synthese des Polydimethylsiloxan-Polyoxazolin-Blockcopolymer (BCs) ($\text{PDMS}_{68}\text{-}b\text{-PMOXA}_{11}$), mit PDMS-monocarbinol als Makroinitiator. Dieses BC wurde in der Arbeit von Karmena Jaskiewicz [78] verwendet und aufgebraucht. Das BC sollte der Veröffentlichung folgend synthetisiert werden. Aufgrund schwieriger Reproduzierbarkeit wurde die Synthese des BCs neu erarbeitet. Im Vergleich zur Vorschrift von Egli et al. wurde auch das PDMS-monocarbinol synthetisiert und die Synthese des BCs wurde hinsichtlich Lösungsmitteln, Reaktionszeiten und Temperaturen optimiert. Im Folgenden werden die einzelnen Stufen dargestellt, die zu dem BC $\text{PDMS}_{65}\text{-}b\text{-PMOXA}_{17}$ führen. Die Synthese anderer Block-Verhältnisse folgt der gleichen Prozedur, es wurde lediglich die Reaktionszeit variiert.

Synthese von Silan terminierten PDMS

Die Synthese des Silan-terminierten PDMS (PDMS-H) folgte Ciolino et al. [146]. Ein Reaktionsschema ist in 4.1 dargestellt.

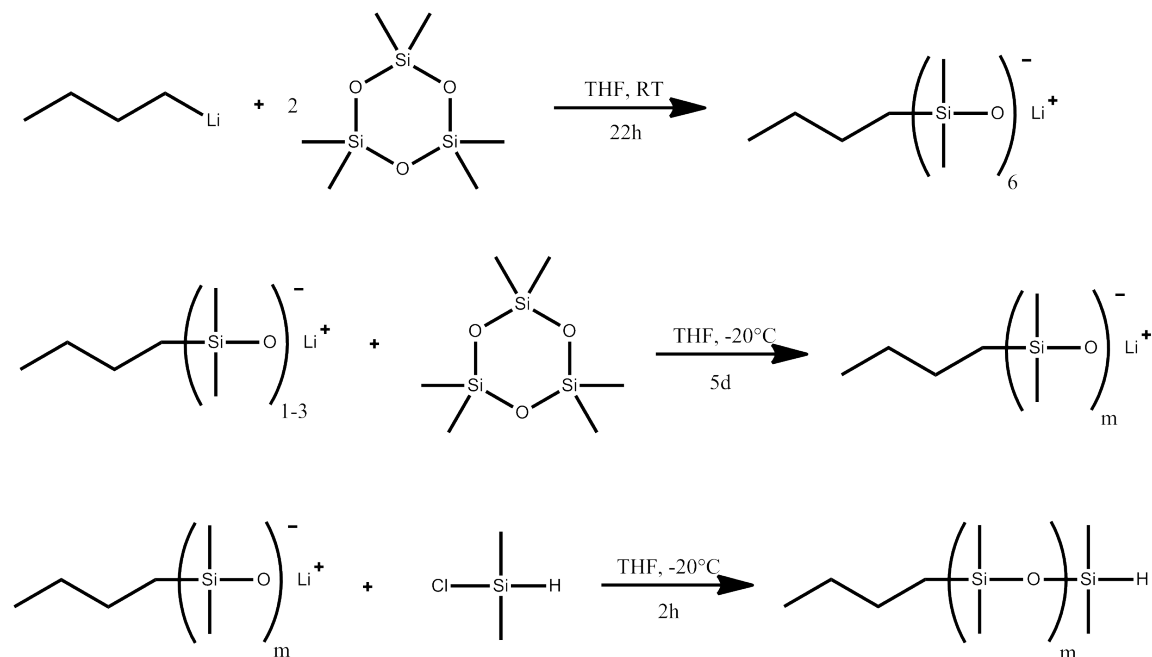


Abbildung 4.1: Reaktionsschema der PDMS-H Synthese.

Alle Reaktionen wurden im Hochvakuum durchgeführt. 15 g frisch sublimiertes Hexamethylcyclotrisiloxan ($\overline{M}_n = 222,46 \text{ g/mol}$, $n = 67,4 \text{ mmol}$) wurde über CaH_2 destilliert und anschließend in 40 ml frisch destilliertem THF gelöst. 3,6 ml dieser Lösung wurden abgefüllt und mit 60 ml frisch destilliertem THF verdünnt. Nach Zugabe von 1,6 ml n -Butyllithium-Lösung (1,6 M Lösung in Hexan, 3,3 mmol) wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 20 h geschüttelt, wodurch das Präpolymer entstand. Daraufhin wurde die restliche Hexamethylcyclotrisiloxan-Lösung zugegeben, mit einem Eintauchkühler (Haake Fisos EK101) auf -20°C gekühlt und für 5 Tage gerührt. Um die Reaktion abzubrechen wurden 3,7 ml Dimethylchlorsilan ($\overline{M}_n = 94,62 \text{ g/mol}$, $n = 33 \text{ mmol}$) unter Argonathmosphäre zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Nach

Abziehen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt dreimal in Methanol gefällt. Das Produkt wurde als klare Flüssigkeit quantitativ erhalten.

Aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 4.2) kann durch Normieren auf die n -Butyl-Startgruppe die molare Masse des Polymers zu $\overline{M}_n = 5000 \text{ g/mol}$ bestimmt werden. Die theoretisch zu erwartende molare Masse war 4500 g/mol . Die Abweichung ist dadurch zu erklären, dass die n -Butyllithium-Lösung geringer konzentriert war, bzw. das Entnehmen der $3,6 \text{ ml}$ für das Präpolymer nicht exakt durchführbar war.

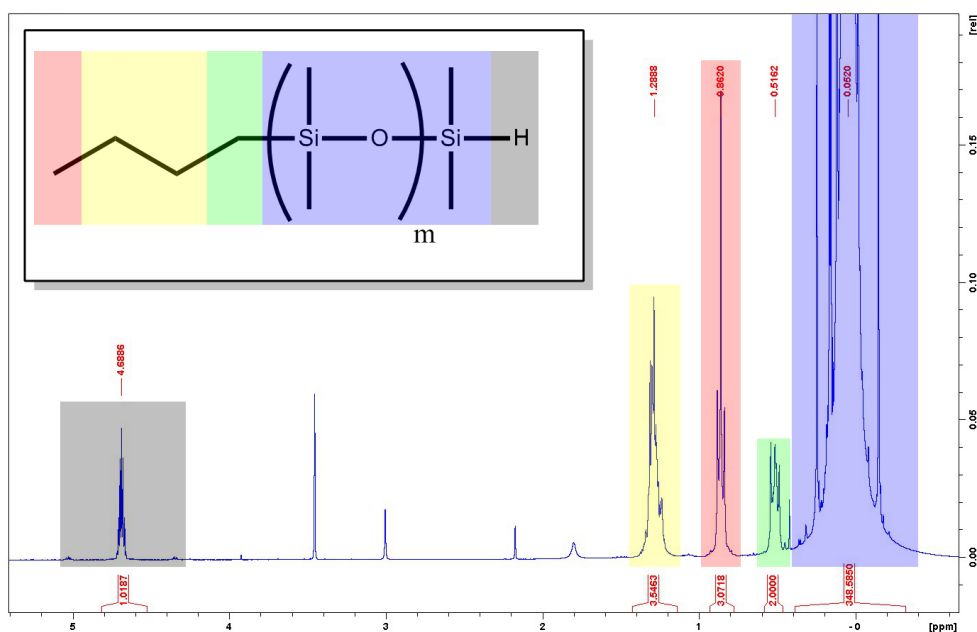


Abbildung 4.2: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von PDMS-H mit Zuordnung der Peaks.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2) $\delta/\text{ppm} = 4,69 \text{ (m, 1H)}$, $1,40 - 1,20 \text{ (m, 4H)}$, $0,86 \text{ (t, 3H)}$, $0,58 - 0,42 \text{ (m, 2H)}$, $0,39 - 0,26 \text{ (bs, 3H)}$

Synthese von PDMS-monocarbinol

Durch Hydrosilylierung des PDMS-H konnte das PDMS-monocarbinol (PDMS-OH) erhalten werden (siehe Abbildung 4.3) [147].

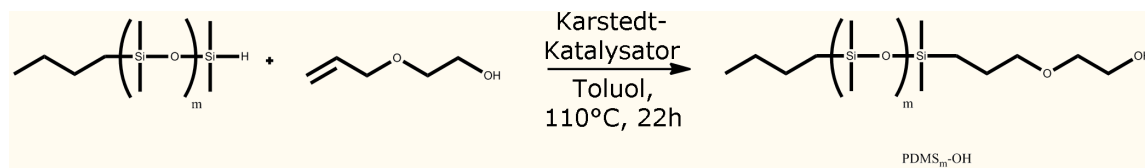


Abbildung 4.3: Reaktionsschema der PDMS-OH Synthese.

Hierzu wurden 15 g PDMS-H ($\overline{M}_n = 5000$ g/mol, $n = 3$ mmol) und 426 μl 2-Allyloxyethanol ($\overline{M}_n = 102,13$ g/mol, $n = 39$ mmol, 1,3 Äq.) in 300 ml trockenem Toluol gelöst, auf 110 °C erhitzt, 5 μl Karstaedt-Katalysator (2% Pt, in Xylol) zugegeben und für 20 h gerührt. Um den Katalysator zu entfernen, wurde die auf 80 °C abgekühlte Lösung mit 10 g Aktivkohle versetzt und für 2 h gerührt. Nach heißer Filtration wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt durch dreimaliges Fällen in Methanol erhalten. Die quantitative Umsetzung zum PDMS-monocarbinol wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nachgewiesen (Abbildung 4.4).

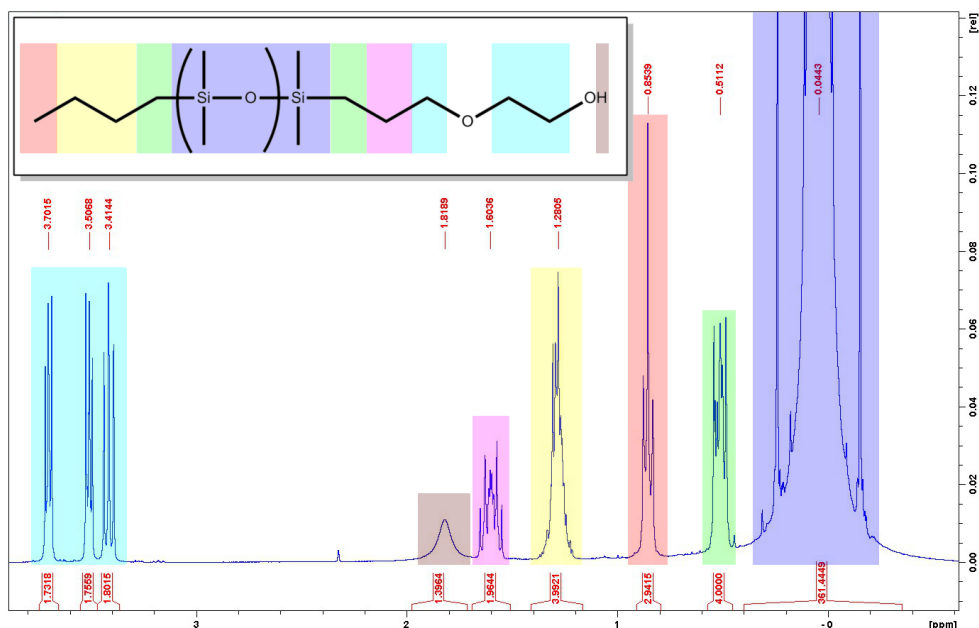


Abbildung 4.4: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von PDMS-monocarbinol mit Zuordnung der Peaks.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2) $\delta/\text{ppm} = 3,75-3,65$ (m, 2H), 3,55-3,47 (m, 2H), 3,47-

4.1. SYNTHESE DES BLOCK-COPOLYMERS

3,35 (m, 2H), 1,90 - 1,7 (s, 1H), 1,66 - 1,52 (bm, 2H), 1,38 - 1,19 (m, 4H), 0,85 (t, 3H),
0,58 - 0,45 (m, 4H), 0,37 - 0,25 (bs, 3H)

Synthese des Blockcopolymer

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

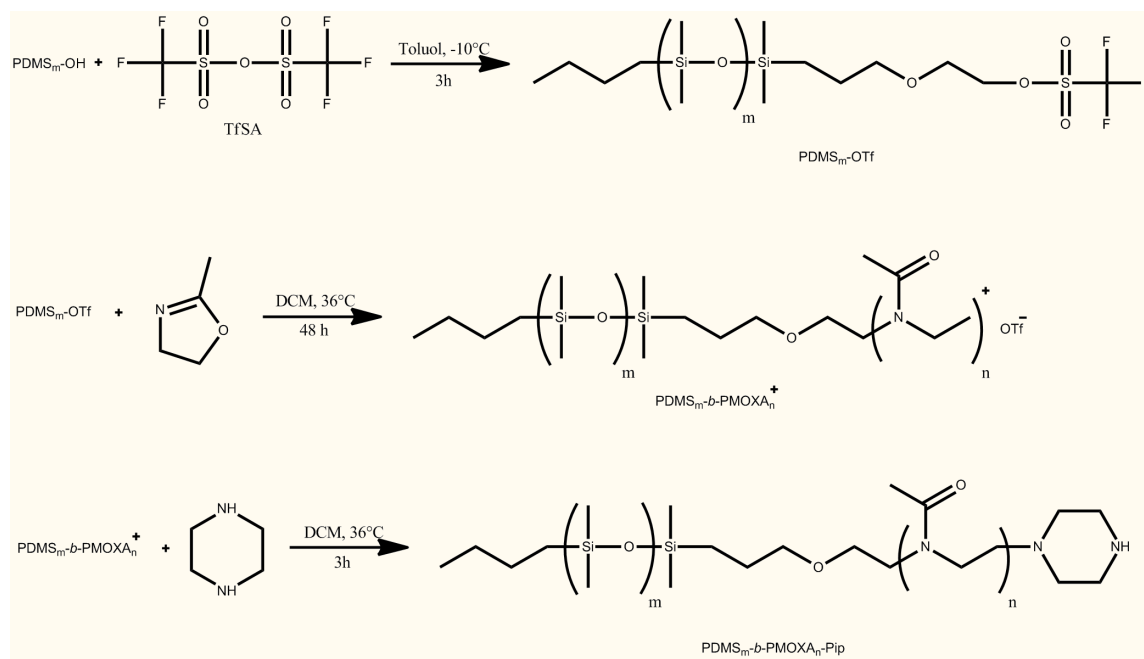


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Reaktionsschritte zur Synthese des PDMS-*b*-PMOXA-Pip.

5,0 g PDMS-monocarbinol ($\overline{M}_n = 5000$ g/mol, $n = 1,00$ mmol) wurden unter Vakuum bei 60°C für 20 h vorgetrocknet. Anschließend wurden unter Argon-Atmosphäre 90 ml trockenes Toluol zugegeben und 24 h in einer mit Molekularsieb 4 \AA gefüllten Soxhlet-Apparatur refluxiert, um letzte Reste Wasser zu entfernen. Das System wurde mit einem Eintauchkühler (von Haake Fisons EK101) auf -10°C temperiert, 208 μl trockenes TEA ($M = 101,19$ g/mol, $d = 0,73$ g/mL, $n = 1,5$ mmol, 1,5 Äq.) und 252 μl TfSA ($M = 282,14$ g/mol, $d = 1,677$ g/ml, $n = 1,3$ mmol, 1,5 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Rühren für 3 h vervollständigt. Von der entstandenen gelb-

orangen Suspension wurde das Toluol verdampft, kaltes Hexan zugegeben und die Lösung über eine Fritte vom ausgefallenen Triflat-Salz getrennt. Das Hexan wurde abermals abgezogen, und das Produkt lag quantitativ als gelbliches Öl vor.

Das frisch synthetisierte PDMS-monotriflat wurde umgehend als Makroinitiator eingesetzt. 5,14 g ($\overline{M}_n = 5148$ g/mol, $n = 1,00$ mmol) wurden in 60 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und 3,387 ml frisch über CaH_2 destilliertes MOXA ($M = 85,11$ g/mol, $d = 1,004$ g/ml, $n = 40$ mmol, 40 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 40 h bei 36°C gerührt. Dann wurden 10 ml 1 M methanolische Piperazin-Lösung zugegeben und die Reaktion durch Rühren für 1 h abgeschlossen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, das Rohprodukt in 100 ml Milli-Q Wasser suspendiert und mit Salzsäure neutralisiert. Nach Gefriertrocknen wurde das Rohprodukt in 160 ml EtOH gelöst, zentrifugiert (40 min, 4000 rpm, 15°C) und anschließend mittels Ultrafiltration in EtOH/Wasser 1:2 über einer Membran (MWCO 3000 kDa) gereinigt. Es ergab sich eine Ausbeute von 95%.

Das entsprechende ^1H -NMR-Spektrum des BCs ist in Abbildung 4.6 dargestellt, wobei festzuhalten ist, dass das Signal der Piperazin-Gruppe nicht eindeutig war und deshalb bei der Integration nicht berücksichtigt wurde.

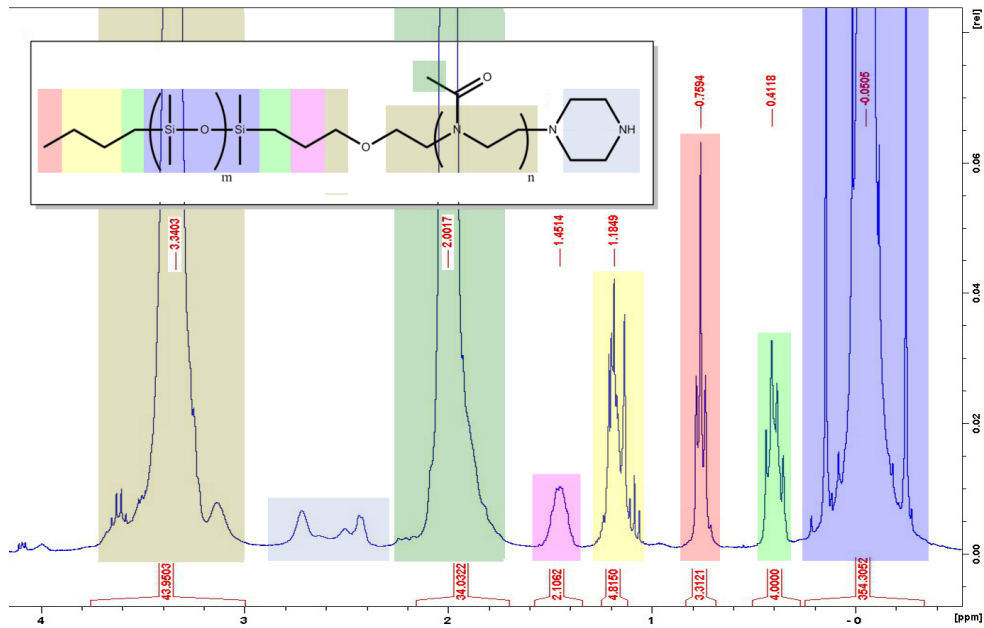


Abbildung 4.6: ¹H-NMR Spektrum von PDMS₆₅-*b*-PMOXA₁₇ mit Zuordnung der Peaks.

¹H-NMR(300 MHz, CD₂Cl₂) δ/ppm = 3,70- 3,00 (bm, 4H), 2,80- 2,35 (m, 5H), 2,15- 1,7 (bm, 3H), 1,55- 1,35 (bm, 2H), 1,25- 1,05 (m, 4H), 0,76 (t, 3H), 0,44- 0,32 (m, 4H), 0,25- 0,35 (bs, 3H)

Aus der Normierung der NMR-Integrale auf die n-Butyl-Gruppe konnte die Anzahl an Wiederholungseinheiten der beiden Blöcke bestimmt werden.

4.2 Herstellung der Lösungen

4.2.1 Herstellung der Polymervesikel

Polymersome wurden durch Filmrehydratation hergestellt und durch anschließendes Extrudieren homogenisiert [67]. 5 mg des PDMS-*b*-PMOXA wurden in einem 10 ml Rundkolben in 5 ml Ethanol gelöst. Durch Verdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 170 mbar) wurde ein dünner Film gebildet, der eine Stunde am Hochvakuum getrocknet wurde. Nach Zugabe von 5 ml MilliQ-Wasser

wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Um die entstandenen Polymervesikel zu homogenisieren, wurden diese extrudiert (LiposoFast™Basic Extruder, Avestin, Ottawa, Canada). Hierzu wurden die Polymersome sukzessiv je 11 mal durch eine Polycarbonat-Membrane (Avestin) mit Porengröße von 800 nm, 400 nm und 200 nm gedrückt. Die finale Konzentration betrug in etwa 0,45 g/l. Durch PCS konnte die Aggregationszahl und somit die Anzahl an Polymer-somen pro ml abgeschätzt werden [148].

Für die SAXS-Messungen (siehe Abschnitt 5.1.3) wurden die Polymersom-Dispersionen durch sanftes Erwärmen im Wasserbad (45 °C) auf ein Viertel des Ausgangsvolumens einreduziert und in die für SAXS-Messungen verwendeten Probenröhrchen (Markröhrchen, Länge 80 mm, Außendurchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,01 mm, Fa. Hilgenberg) gefüllt.

4.2.2 Herstellung von GUVs via *Continuous droplet interface crossing encapsulation*

Die *Continuous droplet interface crossing encapsulation* (cDICE) ist eine Methode zur schnellen und effizienten Herstellung von monodispersen, riesigen, unilamellaren Vesikeln (GUVs), die 2011 von Mabuk et al. erarbeitet wurde [64].

Die GUVs wurden in einem Zylinder (Durchmesser 35 mm, Höhe 6 mm) mit zentrischer Füllöffnung (Durchmesser 10 mm) hergestellt, der durch einen Schrittmotor mit einer Frequenz von 400-2100 Hz um die eigene Achse gedreht wurde (Aufbau siehe Abbildung 4.7 a)). In den rotierenden Zylinder (Standardfrequenz 1800 Hz) wurden der Reihe nach 2 ml Wasser (dispersing aqueous solution (DAS)), 3 ml einer Lösung von Lipiden in Mineralöl (lipid-in-oil solution (LOS)) und 2 ml Dekan gegeben. Aufgrund der verschiedenen Dichten der Lösungen und der Rotation des Zylinders bilden sich senkrechte Schichten (vergleiche Abbildung 4.7 b)). In die Dekan-Schicht wurde

4.2. HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

eine mit Wasser gefüllte Kapillare eingeführt, auf die mit Hilfe von Druckluft ein Druck von 80 kPa ausgeübt wurde. Die entstandenen Tropfen wurden kontinuierlich vom vorbeiströmenden Dekan abgerissen (Dripping). Wegen der höheren Dichte der EAS und der Zentrifugalkraft wurde der Tropfen nach außen transportiert. Der wässrige Tropfen durchlief zunächst die LOS-Phase, in der er mit einer Schicht Lipiden umgeben wurde (Coating). Beim Durchtreten der Lipidwand, die sich zwischen LOS und DAS befand, legte sich eine zweite Lipidschicht um den Tropfen (Zipping), wodurch ein GUV gebildet wurde, welches in der DAS-Phase aufgefangen wurde (siehe Abbildung 4.7 c)). Nach langsamen Anhalten des Schrittmotors konnte die DAS-Phase entnommen und die GUVs konnten verwendet werden.

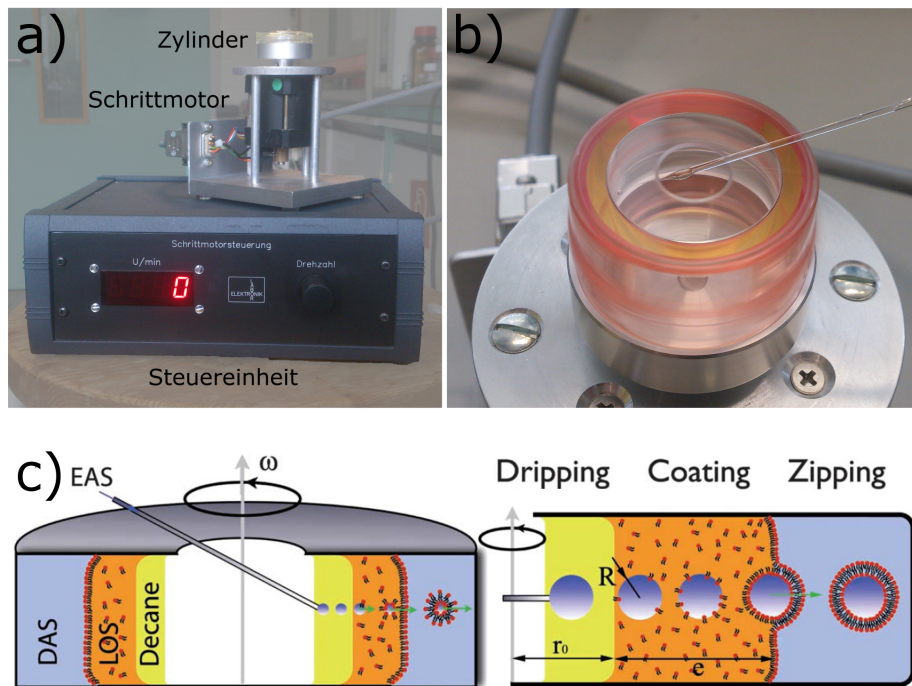


Abbildung 4.7: a) Aufbau des cDICE-Gerätes; b) Darstellung der eingeführten Kapillare und der sich bildenden Schichten; c) Schema des cDICE-Prozesses zur Bildung von GUVs.

Herstellung der LOS

100 mg Lecithin (aus Eiweiß) wurden in einem 30 ml Schraubdeckelglas in 25 ml eines

Chloroform-Methanol-Gemisches (9:1) gelöst. Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde und sich ein Film am Boden des Glases gebildet hatte, wurden 25 ml Mineralöl zugegeben. Nach Quellen für eine Stunde, wurde das Lipid im Ultraschallbad bei maximal 40 °C gelöst. Die hergestellte Lösung wurde 2-3 Tage verwendet.

Modifizierung der Kapillaren

Borsilica-Glas-Kapillaren mit einem Austrittsdurchmesser von 5 μm (Fa. Hilgenbrand) wurden mit einem Zwei-Komponenten Kleber (Epoxidkleber; UHU plus sofortfest) in die Öffnung einer 1 ml-Spritze geklebt. Nach Trocknen wurde die Kapillare an Druckluft angeschlossen und für 30 min in eine 0,1%ige 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan-Lösung (Methanol:Wasser 9:1) getaucht, wodurch eine Silanbeschichtung entstand. Durch diese Beschichtung wurde ein besseres Abperlen der Tropfen bei der GUV-Herstellung gewährleistet. Zum Festigen der Bindungen wurden die modifizierten Kapillaren eine Stunde bei 100 °C getrocknet [64].

4.2.3 Aufarbeiten der Erythrozyten

Erythrozyten (Rote Blutkörperchen, RBC) wurden aus frisch abgenommenem Blut gewonnen und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Ca. 2 ml frisches Blut wurden mit RPMI Medium auf 50 ml verdünnt und dann zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Dies wurde wiederholt, bis der Überstand farblos war. Das Sediment (reine Erythrozyten) wurde abermals verdünnt und mit einem Cell Counter (BIO-RAD TC10™) so eingestellt, dass eine Dispersion mit ca $8 \cdot 10^8$ RBC/ml entstand.

4.2.4 Modifizierung der Au-Nanostäbchen

1 ml der gekauften, CTAB-stabilisierten Au-Nanostäbchen (Fa. Nanoseedz (Hong Kong)) wurden dreimal zentrifugiert (14000 rpm, 10 min), um überschüssiges CTAB zu entfernen. Dann wurde 1 ml 0.3 %ige SDS-Lösung zugegeben und die Dispersion drei Stunden ins Ultraschallbad gegeben, wobei durch Eiskühlung darauf geachtet wurde, dass eine Temperatur von 30 °C nie überschritten wurde. Durch diesen Prozess wurde das positive CTAB durch das negative SDS ersetzt. Um die Nanostäbchen permanent negativ zu laden, wurden die Nanostäbchen nach zweimaligem Zentrifugieren (14000 rpm, 10 min) über Nacht in 1 ml NaOH-MUA-Lösung (je 5 mM) gegeben. Nach zweimaligem Zentrifugieren (14000 rpm, 10 min) wurde das ζ -Potential gemessen (siehe Tabelle 5.4).

4.2.5 Herstellung der Nanopartikel-Vesikel-Lösungen

Nanopartikel/-stäbchen-Poylmersome

Einige μl Polymersom-Dispersion wurden mit so viel μl Nanopartikel-Dispersion versetzt, dass ein Polymersom-Nanopartikel-Verhältnis von 1:2 erhalten wurde.

Nanopartikel-GUVs

Da die Konzentration der GUVs von Ansatz zu Ansatz variierte, wurde immer eine Konzentrationsreihe hergestellt. Dazu wurde die Partikel-Stammlösung (aus Tabelle 3.2) 1:10, 100, 1000, 10000 und 100000 verdünnt. Davon wurden je 10 μl zu 50 μl GUV-Dispersion gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Mischungen mit Konfokalmikroskopie analysiert.

Nanopartikel-Erythrozyten-Mischung

Pro Versuch wurden 200 μl Erythrozyten-Lösung verwendet, zu der so viel Partikel-Dispersion gegeben wurde, dass eine Konzentration von ca 20 Partikel/Erythrozyt vorlag. Die Partikeldispersionen (fluoreszenzmarkierte Siliciumdioxid und Polystyrol-Partikel $d=1\ \mu\text{m}$, siehe Tabelle 3.2) wurden dazu so verdünnt, dass ein Volumen zwischen 10 und 100 μl zu verwenden war. Die Partikel inkubierten über Nacht und wurden direkt für High-Pressure Freezing (HPF) -Experimente verwendet. Für die CLSM wurden die Erythrozyten mit *CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain* markiert.

4.3 Rasterkraft-Experimente

Das Rasterkraftmikroskop wurde einerseits dazu eingesetzt, die Polymervesikel zu charakterisieren, andererseits wurde mit der *Colloidal Probe*-Technik die Wechselwirkung zwischen verschiedenen modifizierten Gold-Partikeln und den Polymersomen analysiert.

Colloidal Probe-Herstellung

Auf einen Cantilever ohne Spitze (MikroScience, N12 AlBS, 0,35 N/m) wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators ein Gold-Partikel mit einem Durchmesser von 1-3 μm geklebt (Zwei-Komponenten-Epoxidkleber; UHU plus endfest 300). Nach Aushärten wurde die Oberfläche 90 s im Argonplasma gereinigt. Die Cantilever wurden dann sofort in eine wässrige, 2 mM Citrat, PEG-COOH ($\overline{M}_n = 5000\ \text{g/mol}$) bzw. CTAB-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur gelagert. Nach 48 h wurden die Cantilever mit MilliQ-Wasser gespült und getrocknet. Exemplarisch ist ein auf einen Cantilever geklebter Gold-Partikel in Abbildung 4.8 dargestellt.

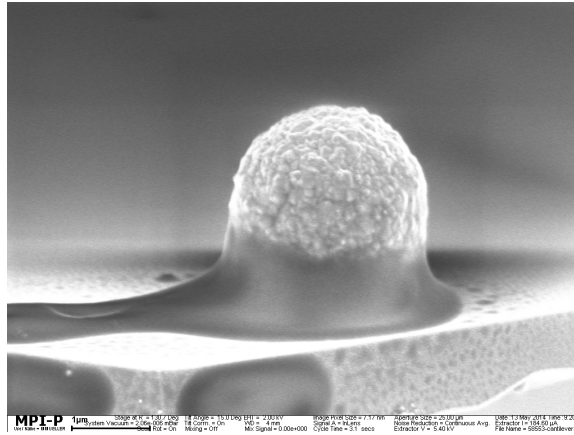


Abbildung 4.8: Scanning Electron Microscopy Image (Maren Müller) eines Gold-Partikels, der auf einen tipless Cantilever geklebt wurde.

AFM-Messung

Für die AFM-Messungen wurde ein 10x10 mm großes Glimmer-Plättchen in den Deckel einer Petrischale mit 70 mm Durchmesser geklebt, welches als Substrat diente. Mit einem Tesa-Film wurde der Glimmer frisch gespalten und 50 ml der 1:4 verdünnten Polymersom-Dispersion aufgetragen. Nach Adsorbieren für 45 min wurde die Petrischale mit Milli-Q Wasser geflutet. Mittels quantitativer Bildgebung (10x10 μm , 256x256 Messpunkte) wurden je Probe mindestens 14 Polymersome abgebildet. Dabei wurden DNP Cantilever (Bruker, Siliciumnitrid, $k_c=0,35 \text{ N/m}$) für die physikalische Charakterisierung der Vesikel verwendet. Bei der Analyse der Wechselwirkung zwischen Polymersomen und Partikeln fanden die oben beschriebenen *Colloidal Probes* Anwendung.

Auswertung

Das Höhenprofil (siehe Abbildung 4.9) wurde mit dem *JKSPM Data Processing* Programm analysiert und die Halbwertsbreite W sowie die Höhe H der Polymervesikel bestimmt, aus denen der Krümmungsradius R mit Formel 3.8 berechnet wurde.

Die Rohdaten für die Kraft-Abstands-Kurven sowohl auf den Vesikeln, als auch auf dem Substrat wurden aus den QI-Datensätzen extrahiert und einzeln abgespeichert. Die Rohdaten, d.h. die Werte des Detektorsignals in Volt als Funktion der Position des Piezotranslators in Nanometer, wurden mit Hilfe einer dafür von Michael Kappl (MPI für Polymerforschung) entwickelten Software in Kraft-Abstands-Kurven umgerechnet. Dafür wurden zunächst die auf dem Substrat gemessenen Daten verwendet, um den Umrechnungsfaktor zwischen Detektorspannung in Volt und der Auslenkung des Federbalkens in Nanometern zu ermitteln (sog. deflection sensitivity). Mit Hilfe dieses Umrechnungsfaktors konnten dann die Rohdaten für die Vesikel folgendermaßen umgerechnet werden: Als erstes wurde der Bereich der Messkurve, bei dem sich die Spitze noch nicht im Kontakt mit dem Vesikel befand linear angefitet und diese Fitgerade von den Daten abgezogen, um einen eventuellen Offset des Detektorsignals auszugleichen. Um den Nullpunkt der Distanz-Achse zu bestimmen, wurde der Kontaktbereich der Rohdaten, d.h. der Bereich, in dem es durch den zunehmenden Kontakt zwischen Spitze und Vesikeln zu einer Verbiegung des Federbalkens kommt, ebenfalls linear angefitet. Der Schnittpunkt der beiden Fitgeraden wurde als Nullpunkt der Distanz-Achse gesetzt. Anschließend wurde das Detektorsignal in Volt mit Hilfe des wie oben beschriebenen Umrechnungsfaktors (deflection sensitivity) in die Deflektion des Federbalkens in Nanometern umgerechnet. Für jeden Datenpunkt wurde dann die Deflektion von der Piezoposition abgezogen, um die absolute Distanz zwischen Spitze und Vesikeloberfläche zu erhalten. Zuletzt wurde die gemessene Deflektion des Federbalkens durch Multiplikation mit dessen Federkonstante in Kraft umgerechnet. Aus dem linearen Fit des Kontaktbereichs der Kraft-Abstands-Kurve erhielt man die Steifheit k_{mem} der Polymersomen. Aus dieser Steifheit und dem Krümmungsradius R wurden dann Elastizitätsmodul und Biegemodul mit Hilfe der Gleichungen 3.7 und 3.9 berechnet.

Die Federkonstanten aller verwendeter Cantilever wurden mit der *thermal noise*-Methode bestimmt [149].

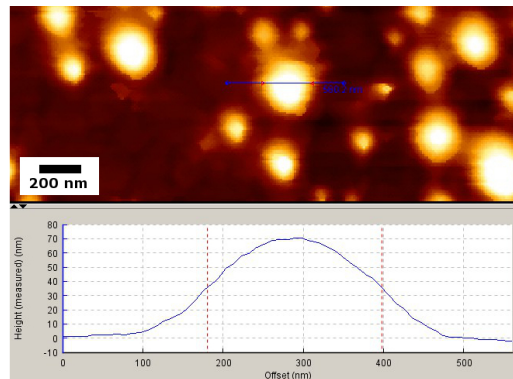


Abbildung 4.9: Aus einer QI-Datei extrahiertes Höhenprofil mit exemplarischer Bestimmung der Höhe H und Breite W eines adsorbierten Polymersoms.

4.4 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Probenpräparation

Die Probenpräparation folgte dem Protokoll von Iancu et al. [150]. Alle Cryo-TEM-Proben wurden mit einem Vitrobot Mark II der Marke FEI präpariert. Die verwendeten *Blotting*-Parameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Es wurden Lacey Trägernetze (Lacey Support Films - NetMesh™Grids, Cu-mesh 400) oder Trägernetze mit Kohleloch-Film (QUANTIFOIL®R2/2, Cu-mesh 300) verwendet, die durch Plasmabehandlung (Diener electronic, FEMTO; O₂-Fluss = 4; 15 % Leistung, 36 s) direkt vor der Probenpräparation hydrophilisiert wurden. Zum Vitrifizieren wurde aufgrund der maximalen Abkühlgeschwindigkeit [151] flüssiges Ethan verwendet. Vitrifizierte Proben wurden bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 4.1: Parameter, die zum Blotten verwendet wurden.

Luftfeuchtigkeit	> 90 %
Anzahl <i>Blotten</i>	1
<i>Blotting</i> -Zeit	4 - 7 s
Offset	-3

Messung

Die Proben wurden mit einem JEOL1400EM, welches mit 120 kV betrieben wurde, bei cryogenen Temperaturen analysiert. Dabei wurde mit mittlerer Elektronendosis (Spotsize 3) und einer Objektivblende gearbeitet. Beim Aufnehmen mit einer CCD-Kamera (Gatan) wurde ein Unterfokus von wenigen μm eingestellt. Die Bilder wurden anschließend mit dem Programm ImageJ bearbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

Wie in der Einleitung dargestellt, ist es Ziel dieser Arbeit, den transmembranen Transport von (Nano-)Partikeln in verschiedenen Systemen zu analysieren. In diesem Kapitel werden die erzielten Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Synthese des Blockcopolymers, der daraus hergestellten Polymersome und deren physikalischer Charakterisierung eingegangen. Anschließend werden die AFM-Ergebnisse zur Analyse der Interaktionen zwischen verschiedenen, immobilisierten Partikeln und Polymersomen präsentiert. Im darauf folgenden Abschnitt wird ausgeführt, welche Szenarien sich ergeben, wenn verschieden modifizierte Gold-Nanopartikel zu der Polymersom-Dispersion gegeben werden. Durch Verwenden von Gold-Nanostäbchen wird im anschließenden Abschnitt der Einfluss der Form auf die Interaktion analysiert. Des Weiteren soll eine Brücke vom Minimal-Modellsystem der Polymersome hin zu einem natürlichen System geschlagen werden, den Erythrozyten. Deshalb wird das Modellsystem der riesigen unilamellaren Vesikel (GUVs) eingeführt und an diesem System die Interaktionen mit verschiedenen, unterschiedlich modifizierten Partikeln analysiert. Abschließend werden die Aufnahmeexperimente an Erythrozyten dargestellt und diskutiert.

5.1 Das Minimal-Modellsystem der Polymersome - Teil 1: Aufbau und Charakterisierung

In diesem Kapitel wird das von Jaskiewicz et al. eingeführte Minimal-Modellsystem einer Zelle weiter ausgearbeitet. Hierzu wird zunächst auf die Synthese und Charakterisierung des zugrunde liegenden Blockcopolymers eingegangen. Anschließend werden die Eigenschaften der Polymersome diskutiert.

5.1.1 Synthese des Blockcopolymers

Nach dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Syntheseweg wurden Blockcopolymere (BCs) mit konstantem PDMS-Block von ca. 65 Wiederholungseinheiten und variablem PMOXA-Block hergestellt. Dabei wurde immer mit 40 Äquivalenten MOXA gearbeitet und die Blocklänge des PMOXA-Blocks durch Abbruch der Reaktion nach definierten Zeiten eingestellt und mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verifiziert (vergleiche Abbildung 5.1).

Die Abhängigkeit der Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten von der Polymerisationszeit ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten und der Polymerisationszeit festzustellen, der mit dem vergleichbar ist, welcher in der Literatur zu finden ist [152]. Unterschiede in der Steigung (entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit) sind auf mehrere Faktoren, wie ein anderes Lösungsmittel, eine andere Konzentration des Monomers, ein anderer Initiator oder ein unterschiedliches Verhältnis von Monomer zu Initiator zurückzuführen - alles Komponenten, die bekannterweise die Kinetik der Polymerisation beeinflussen [152–155]. Es ist somit zu folgern, dass der verwendete Makroinitiator PDMS-monocarbinol analog zu den in der Literatur verwendeten Initiatoren reagiert.

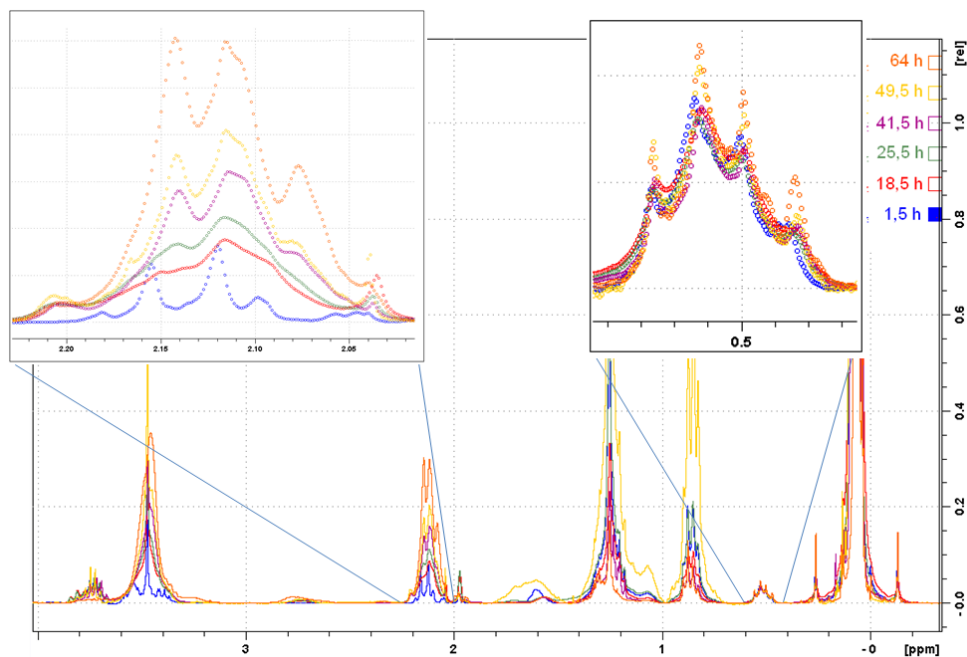


Abbildung 5.1: Überlagerte ¹H-NMR-Spektren von PDMS₆₅-*b*-PMOXA_{*i*} für Polymerisationszeiten von 1,5, 18,5, 25,5, 41,5, 49,5 und 64 h, die das Ansteigen der Wiederholungseinheiten des PMOXA-Blocks zeigen. Damit kann ein präzises Einstellen des Blockverhältnisses durch die Reaktionsdauer erreicht werden.

Beim Durchführen von GPC-Messungen zur Analyse des BCs mit 17 MOXA-Wiederholungseinheiten wurde festgestellt, dass das BC in dem in der Literatur [145] verwendeten Lösungsmittel THF augenscheinlich Aggregate bildete. Um GPC-Messungen durchführen zu können, wurde das BC in den für GPC gut zugänglichen Lösungsmitteln Aceton, Dimethylformamid (DMF), Hexafluorisopropanol (HFIP), Dichlormethan (DCM) und N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst und mittels Lichtstreuung (Christine Rosenauer, MPI für Polymerforschung) geprüft, ob sich Aggregate gebildet haben (siehe Abbildung 5.3). Lediglich Aceton zeigt einzelne Polymerketten. Bei DCM konnte gar kein Signal detektiert werden. In allen anderen Lösungsmitteln lagen Aggregate vor.

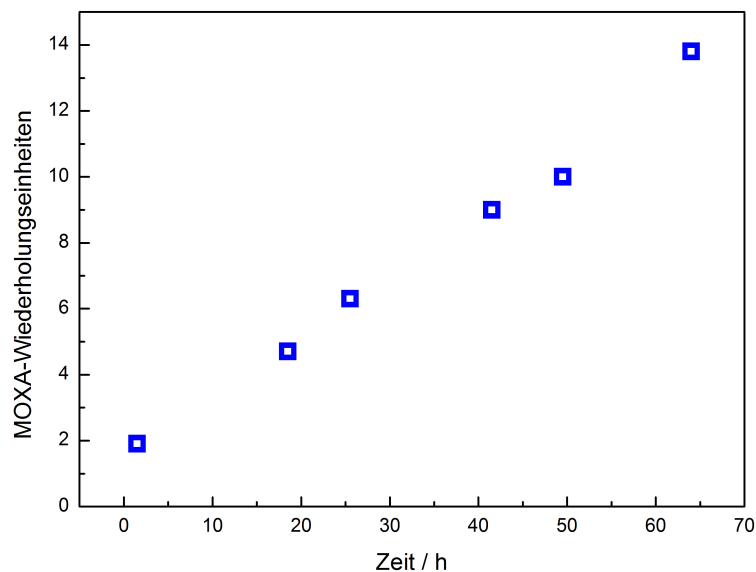


Abbildung 5.2: Linearer Zusammenhang der MOXA-Wiederholungseinheiten mit der Zeit.

Mit DCM und Aceton wurden GPC-Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 5.4), wobei molare Massen von ca. 2000 g/mol erhalten wurden. Es sei anzumerken, dass schon der eingesetzte Makroinitiator eine höhere molare Masse besaß (ca. 5000 g/mol, siehe 4.1). Auch NMR-Experimente des BCs widersprechen dem GPC-Resultat, da hier eine molare Masse von ca. 6000 g/mol erhalten wurde (vergleiche Abbildung 4.6). Es ist somit anzunehmen, dass das amphiphile BC im Zusammenspiel mit dem Lösungsmittel und dem Packungsmaterial der GPC-Säule unerwartete Wechselwirkungen zeigte, weshalb keine brauchbare Elution erfolgte. Für dieses BC ist GPC keine anwendbare Charakterisierungsmethode, was an sich für amphiphile Blockcopolymere keine Seltenheit ist, jedoch der Literaturangabe von Egli et al. widerspricht [145].

Zeitgleich wurden auch von Amelie Koch BCs synthetisiert [148]. Insgesamt wurden somit BCs hergestellt, deren Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten im Bereich zwischen 4 und 28 lag. Diese BCs zeigten unterschiedliche Aggregatzustände (siehe

5.1. POLYMERSOME: AUFBAU UND CHARAKTERISIERUNG

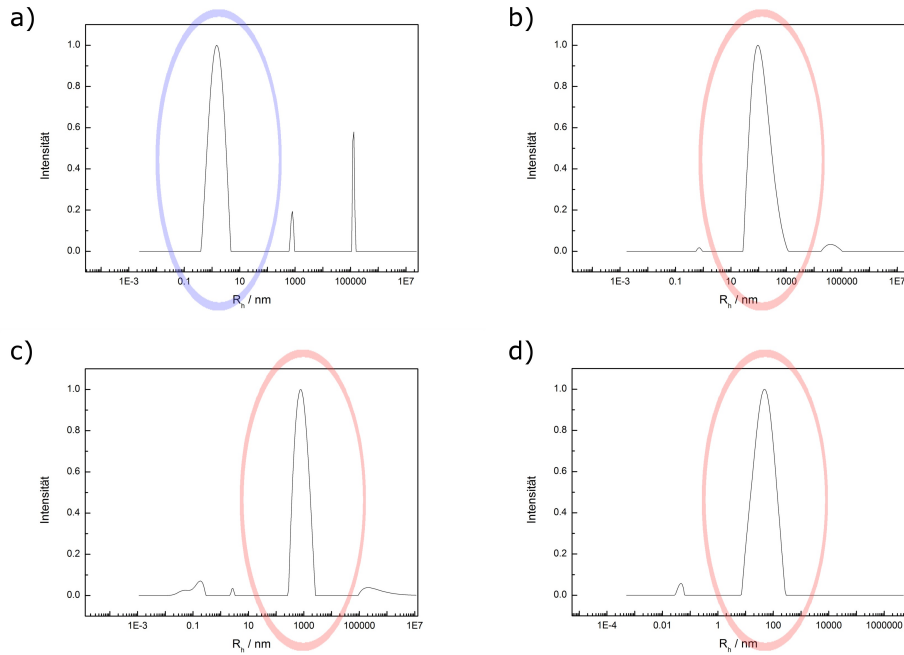


Abbildung 5.3: Größenverteilung der Lichtstreu-Experimente in verschiedenen Lösungsmitteln, wobei Peaks ab 1000 nm von Verunreinigungen wie Staub resultieren können; a) In Aceton liegen einzelne Polymere vor (blau umrandet); In b) DMF, c) HFiP und d) NMP bildeten sich Aggregate (rot umrandet).

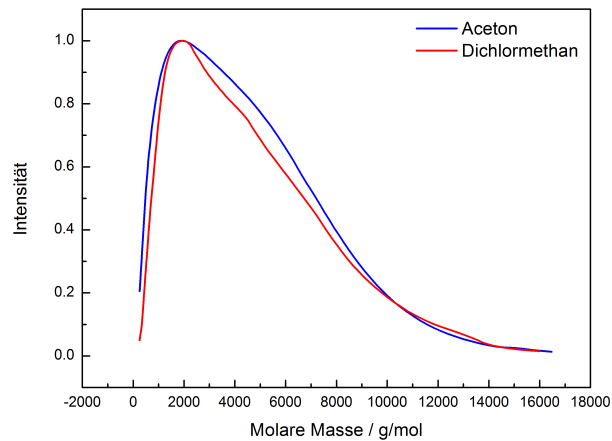


Abbildung 5.4: Molmassenverteilung des BCs aus GPC-Messungen in Aceton (blau) und DCM (Rot), gegen PDMS-Standard ausgewertet.

Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Zusammenhang zwischen MOXA-Wiederholungseinheiten und Aggregatzustand des entsprechenden BCs.

MOXA-WE	Aggregatzustand
4-6	zähflüssig
11-21	klebrig
28	kristallin

5.1.2 Polymersom-Herstellung

Aus allen BCs wurde versucht, mittels Film-Rehydrierung (siehe Abschnitt 4.2.1) Polymersome herzustellen. Es war festzustellen, dass BCs, deren Aggregatzustand zähflüssig war, keinen Film und mit dieser Methode folglich auch keine Polymersome bildeten. Andererseits bildeten BCs mit 28 MOXA-Wiederholungseinheiten einen Film, der sich jedoch nicht rehydrieren ließ. Proben, die nach Filmrehydratation eine trübe Dispersion ergaben, wurden von Amelie Koch mittels PCS auf Vesikelbildung hin analysiert. Es war festzustellen, dass im Bereich zwischen 11 und 21 MOXA-Wiederholungseinheiten Polymersome gebildet wurden. Das Polymersom-System von Karmena Jaskiewicz [118] wurde als Referenz gesetzt, und es wurde nur dann mit den Proben weitere Versuche durchgeführt, wenn die hergestellten Polymersome bei PCS-Messungen der Referenz entsprachen.

5.1.3 Bestimmung der Membrandicke der Polymersome

Wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, hängen die physikalischen Eigenschaften der Membran von deren Dicke ab. Deshalb wurde die Membrandicke mit verschiedenen Methoden bestimmt.

Bestimmung der Membrandicke mit Cryo-TEM

Polymersom-Dispersionen aus BCs mit 11, 15, 17 bzw. 21 MOXA-Wiederholungseinheiten

5.1. POLYMERSOME: AUFBAU UND CHARAKTERISIERUNG

ten wurden analysiert. Dazu wurden von jeder Probe Cryo-TEM-Abbildungen aufgenommen und an verschiedenen Polymersomen 200-mal die Membrandicke gemessen (maximal vier Messstellen pro Polymersom). Abbildung 5.5 zeigt jeweils eine exemplarische Cryo-TEM-Aufnahme und die Verteilung der Membrandicken der entsprechenden Polymersome.

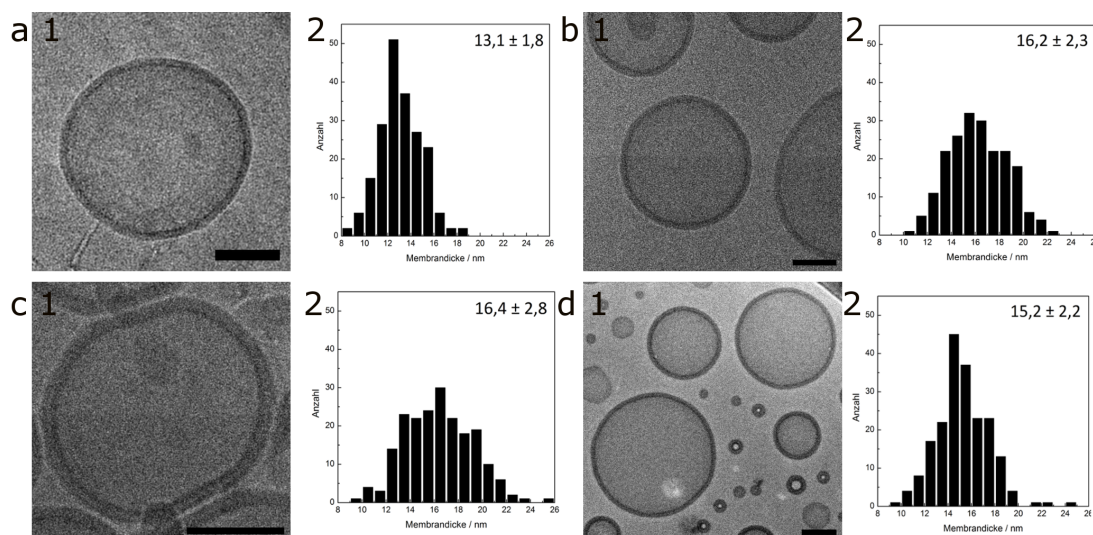


Abbildung 5.5: Cryo-TEM-Abbildungen von Polymersomen mit 11 (a 1), 15 (b 1), 17 (c 1) bzw. 21 (d 1) MOXA-Wiederholungseinheiten und der entsprechenden Verteilung der Membrandicke (a 2-d 2). Die Balkenskala in den Cryo-TEM-Abbildungen entspricht 100 nm.

Die erhaltenen Membrandicken sind in Abbildung 5.6 gegen die Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten aufgetragen, wobei keine Korrelation zu erkennen ist. Da der Fehler der Cryo-TEM-Messungen mit ca. 12% relativ groß ist, und um eine alternative Methode zur Bestimmung der Membrandicke zu haben, wurde Kleinwinkelröntgenstreuung (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) durchgeführt [156].

Bestimmung der Membrandicke mit SAXS

Zur Bestimmung der Membrandicke mittels SAXS wurden wiederum die Polymer-

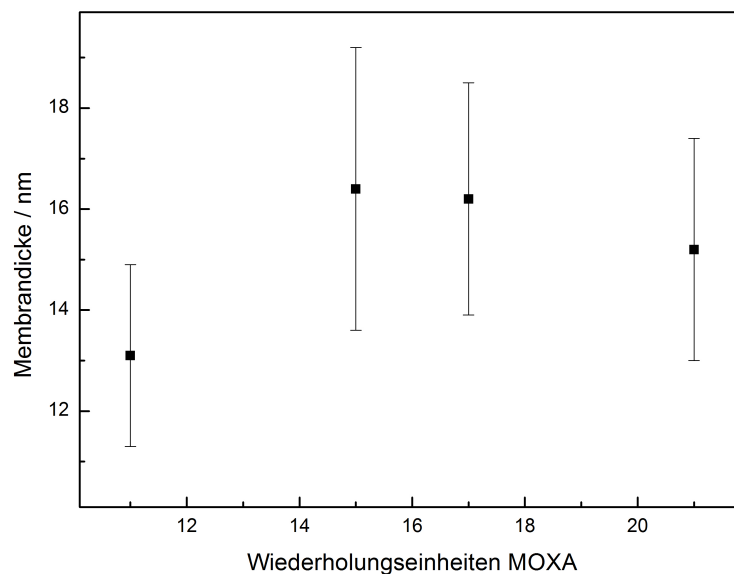


Abbildung 5.6: Zusammenhang zwischen MOXA-Wiederholungseinheiten und der durch Cryo-TEM bestimmten Membrandicke.

some aus BCs mit 11, 15, 17 und 21 MOXA-Wiederholungseinheiten analysiert. Die erhaltenen Streukurven sind in Abbildung 5.7 a) dargestellt. Dabei war festzustellen, dass die Probe mit 11 MOXA-Wiederholungseinheiten (lila Streukurve in Abbildung 5.7 a)) komplett im Rauschen unterging und somit kein verwertbares Signal lieferte. Das Signal der anderen Proben ging ab einem Wert von $5 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ ebenfalls im Rauschen unter (grau hinterlegter Bereich in Abbildung 5.7 a)). In dem Bereich bis $5 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ sehen die Streukurven für alle Proben sehr ähnlich aus (mit blauen Rahmen in Abbildung 5.7 a) hervorgehoben). Der Abfall aller Streukurven, aus welchen die Membrandicke extrahiert werden kann, fiel für alle Proben zusammen (erstes Minimum in Abbildung 5.7 a), mit einem Pfeil markiert).

Unter Annahme eines Kern-Schale-Systems (*Core-Shell*-System), mit Wasser als innerer und äußerer Phase, wurde ein einfacher Fit durchgeführt (siehe Abbildung 5.7 b)). Wie oben ausgeführt, entspricht das erste Hauptminimum der Schalendicke, die

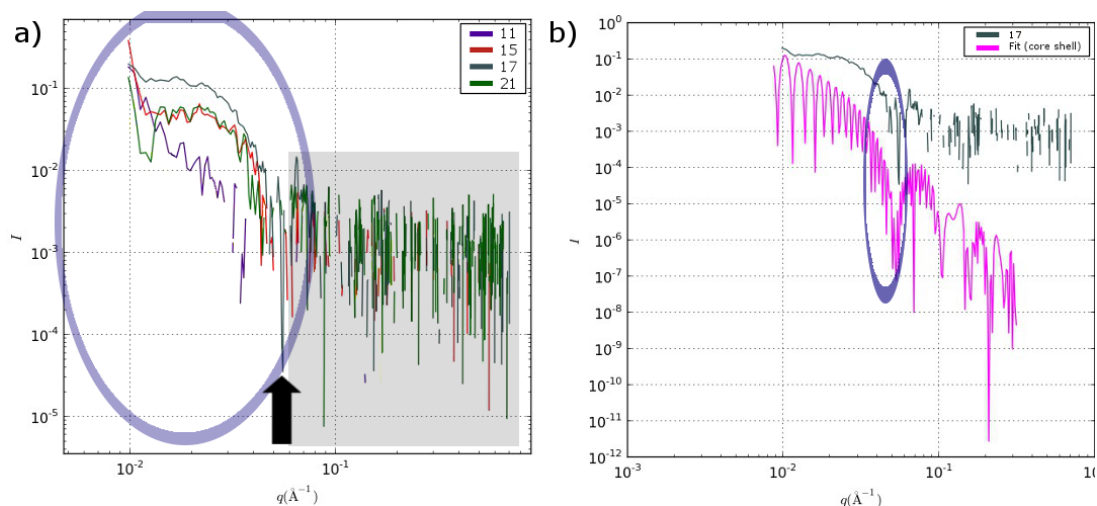


Abbildung 5.7: a) SAXS-Kurven der Proben mit 11, 15, 17 bzw. 21 MOXA Wiederholungseinheiten. b) Exemplarische SAXS-Kurve mit Fit eines Kern-Schale Modells

sich mit diesem einfachen Fit zu ca. 11 nm ergab. Dieser Wert lag deutlich unter denen der Cryo-TEM-Messungen. Aus der Tatsache, dass alle Proben eine Schalendicke von ca. 11 nm zeigten, ist zu folgern, dass nur der hydrophobe PDMS-Teil der Membran detektiert wurde, der bei allen Proben identisch ist. Es ist anzunehmen, dass die PMOXA-Blöcke in Wasser gequollen waren, sich also Wasser zwischen die PMOXA-Blöcke einlagerte, wodurch kein detektierbarer Kontrast zwischen PMOXA-Schicht und dem äußeren Medium Wasser vorlag.

Das Problem des Rauschens (vergleiche Abbildung 5.7 a) könnte gelöst werden, indem eine höher konzentrierte Polymersom-Dispersion verwendet wird. Erhöhte man bei der Herstellung der Polymersome jedoch die Konzentration der BCs (vergleiche Abschnitt 4.2.1), bildeten sich keine unilamellaren Strukturen mehr, sondern es traten multilamellare Strukturen auf (siehe Abbildung 5.8), welche nicht mehr als Zell-Modell verwendet werden konnten. Eine weitere Option war, die hergestellte Polymersom-Dispersion durch sanftes Eindampfen zu konzentrieren, was schon bei der Probenpräparation für die SAXS-Messungen stattfand. Wurden die Dispersionen jedoch auf mehr als ein Viertel des Ausgangsvolumens reduziert, war Agglomeration

zu beobachten und die Lösung wurde klar.

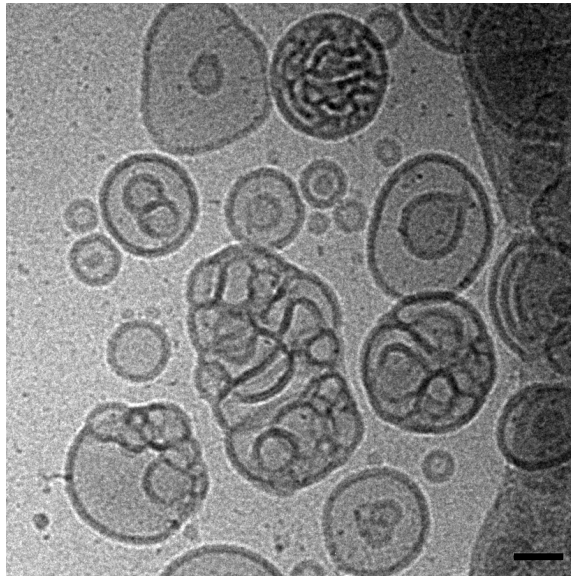


Abbildung 5.8: Cryo-TEM-Aufnahme von multilamellaren Strukturen, die bei der Verwendung von höheren BC-Konzentrationen bei der Polymersom-Herstellung entstanden.

Die Membrandicke konnte somit aus diesen SAXS-Messungen nicht gewonnen werden. Für die Berechnung der physikalischen Eigenschaften der Polymersome im nächsten Abschnitt werden somit die Membrandicken aus den Cryo-TEM-Messungen verwendet.

5.1.4 Physikalische Eigenschaften der Polymersome

Wie in Abschnitt 3.1.3 dargestellt, sind die physikalischen Eigenschaften eines Vesikels vor allem durch den Elastizitäts- und den Biegemodul definiert, welche aus quantitativen, bildgebenden AFM-Messungen gewonnen werden konnten.

Es wurden dieselben Polymersome wie in Abschnitt 5.1.3 verwendet. Exemplarische Höhenprofile mit einer auf dem Zentrum eines Polymersoms aufgenommenen Detektorsignal-Piezo-Positions-Kurve sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Von jeder Polymersom-Dispersion wurden mindestens 14 Polymersome analysiert. Aus den

Höhenprofilen wurden die Breite W und die Höhe H der auf Glimmer gespreiteten Polymersome bestimmt. Mit Formel 3.8 wurde der Krümmungsradius R berechnet. Aus den normierten Kraft-Abstands-Kurven (*force distance curves*, FD-Kurven) wurde durch lineares Fitten der Steigung im Kontaktbereich die Steifheit k_{mem} der Polymersomen gewonnen. Mit den Formeln 3.7 und 3.9 wurden der Elastizitäts- sowie der Biegemodul berechnet. Die Mittelwerte sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Eine Auflistung aller Einzelwerte ist im Anhang in den Tabellen 6.1 - 6.4 zu finden.

Tabelle 5.2: Elastizitätsmodule E und Biegemodule k_{bend} der Polymersome aus BCs mit unterschiedlicher Anzahl an MOXA Wiederholungseinheiten (MOXA-WE).

MOXA-WE	E / MPa	k_{bend} / 10^{-19} J
11	20,8	51,8
15	25,0	122,6
17	35,5	167,6
21	19,4	75,7

Bei der Auftragung des Elastizitätsmoduls bzw. des Biegemoduls gegen die Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten (Abbildung 5.10 a) bzw. b)) ist zu erkennen, dass die Werte der Modi für die ersten drei Messpunkte ansteigen und zum letzten Wert hin stark abfallen.

Es ist anzumerken, dass die ersten drei Proben aus demselben, letztere aus einem separaten Ansatz stammten. Dies könnte zur Folge haben, dass durch minimal veränderte Reaktionsbedingungen eine andere Polydispersität vorliegt. Es ist bekannt, dass das Einbringen von Fremdmolekülen in die PDMS-*b*-PMOXA-Membran deren physikalische Eigenschaften beeinflusst [157]. Es könnte sein, dass die Probe mit 21 MOXA-Wiederholungseinheiten eine höhere Polydispersität besitzt, also eine breitere Molmassenverteilung vorliegt. Dies hätte zur Folge, dass die Membran inhomogener aufgebaut ist, sprich mehr Defekte in der Membran entstehen, wodurch diese weniger stabil und somit elastischer ist als der Trend der anderen Proben erwarten lässt.

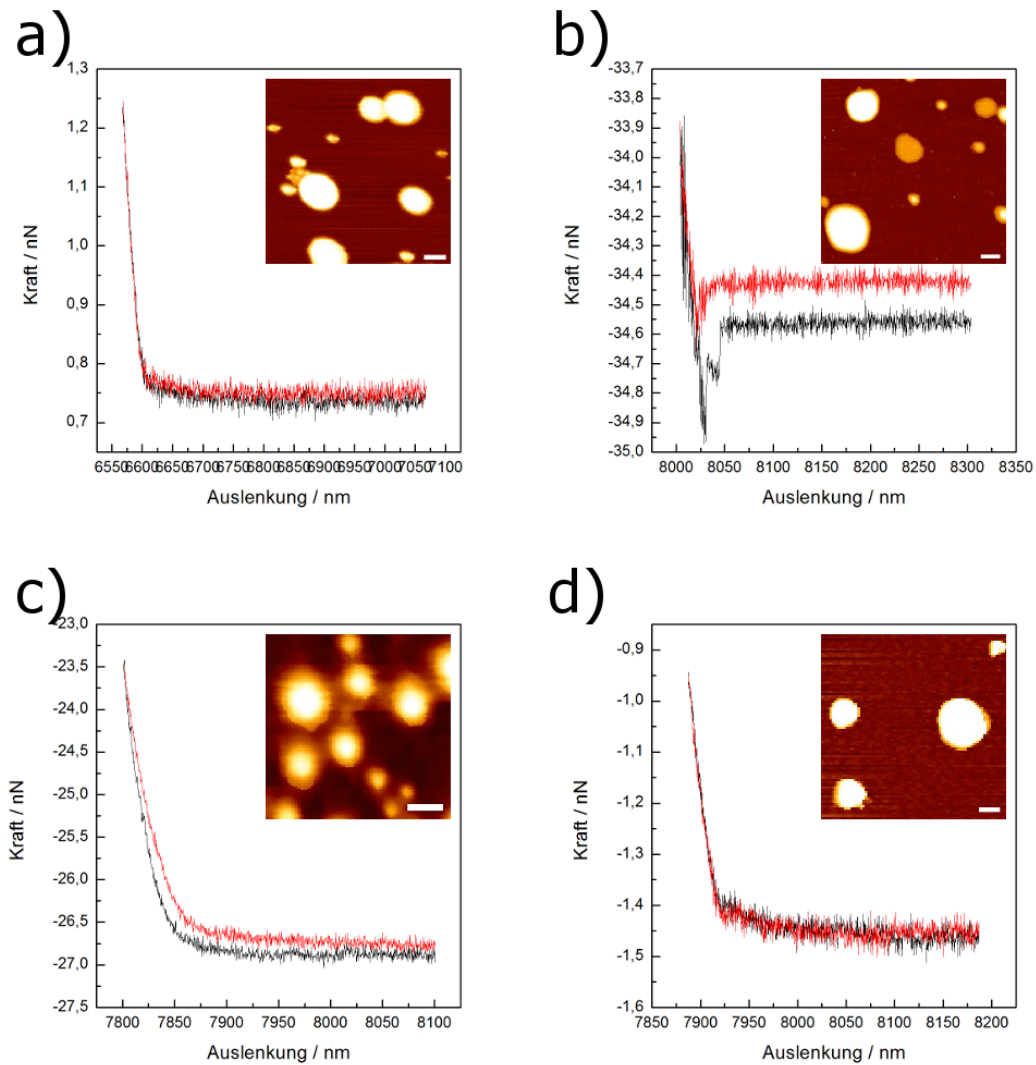


Abbildung 5.9: Detektorsignal-Piezo-Positions-Kurven von Polymersomen aus BCs mit 11 (a), 15 (b), 17 (c) bzw. 21 (d) MOXA-Wiederholungseinheiten. In der Einfügung sind entsprechende Höhenprofile dargestellt, wobei die Balkenskala 200 nm entspricht.

Vernachlässigt man aus diesem Grund den letzten Messpunkt in Abbildung 5.10, ist zu beobachten, dass die physikalischen Eigenschaften Elastizitäts- und Biegemodul mit zunehmender Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten ansteigen. Der Bereich, in dem die Elastizitätsmodule liegen (19-35 MPa) ist jedoch aufgrund der verwendbaren BCs beschränkt (nur BCs mit 11-21 MOXA-Wiederholungseinheiten bilden Polymersome, vergleiche Abschnitt 5.1.2). Der erhaltene Bereich deckt sich mit dem

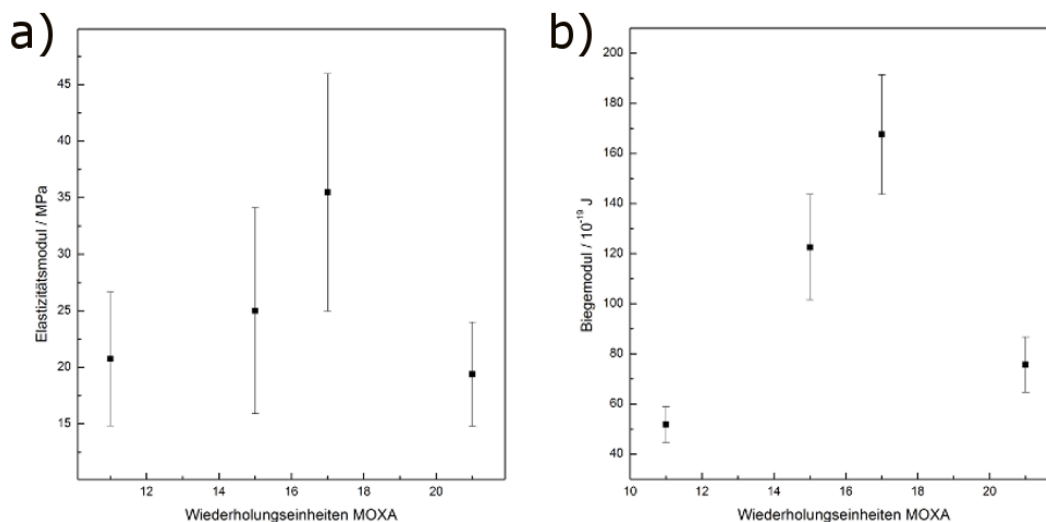


Abbildung 5.10: Elastizitäts- (a) und Biegemodul (b) in Abhängigkeit von der Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten.

Literaturwert von 17 ± 11 MPa für Polymersome aus PDMS₆₈-*b*-PMOXA₁₁ [81].

Das von von Karmena Jaskiewicz eingeführte Minimal-Modellsystem der Polymersome wurde reproduziert und es wurden weitere Erkenntnisse darüber erlangt, welche in zukünftigen Experimenten wertvolle Informationen liefern. Alle im folgenden beschriebenen Ergebnisse stammen aus Versuchen mit Polymersomen, die aus BCs mit 17 MOXA-Wiederholungseinheiten hergestellt wurden, da diese in PCS-Messungen identisch zu der Referenz von Jaskiewicz et al. waren. Sie besaßen einen Durchmesser von 250 nm [148].

5.2 Das Minimal-Modellsystem der Polymersome - Teil 2: Wechselwirkungen zwischen Polymersomen und Nanopartikeln

Im vorhergehenden Abschnitt wurden die Ergebnisse aus der Synthese der Blockcopolymer dargestellt und die daraus hergestellten Polymersome charakterisiert. Es

wurde somit das Zell-Modellsystem der Polymersome vollständig eingeführt. Will man nun den transmembranen Transport von Nanopartikeln (NPs) analysieren, ist es wichtig, Informationen über die Wechselwirkungen zwischen NPs und Polymersomen zu erhalten, womit sich am Anfang des folgenden Abschnitts beschäftigt wird. Danach werden die Szenarien beschrieben, die sich ergeben, wenn verschiedene NPs mit Polymersomen gemischt werden. Anschließend werden Informationen über den molekularen Aufbau der Membran von Polymersomen aus Cryo-TEM-Aufnahmen gewonnen und mit Computersimulationen verglichen. Abschließend wird der Einfluss der Form der Nanopartikel auf die Aufnahme in Polymersome analysiert.

5.2.1 Analyse der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen modifizierten Partikeln und Polymersomen mittels AFM

Wie oben erwähnt, ist es für das Verständnis des transmembranen Prozesses wichtig, welche Kräfte zwischen den Polymersomen und verschiedenen modifizierten (Nano-)Partikeln herrschen. Um die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Polymersomen verstehen zu können, wurden AFM-Messungen durchgeführt.

Im ersten Ansatz sollte auf eine, mit Focused-Ion-Beam (FIB) zugeschnittene Spitze eines Cantilevers (siehe Abbildung 5.11; angefertigt von Maren Müller, MPI für Polymerforschung) mit Hilfe eines Mikromanipulators ein einzelner Nanopartikel geklebt werden, der im AFM eingesetzt werden sollte. Jedoch war die Spitze zu scharf, damit ein Partikel daran haften konnte.

Im nächsten Ansatz sollte die Spitze eines Cantilevers durch Überziehen mit Epoxy-Kleber und anschließendem Eintauchen in einen Nanopartikelhaufen mit Partikeln bedeckt werden [158], was jedoch daran scheiterte, dass es aufgrund der geringen Nanopartikelkonzentration nicht möglich war, einen Haufen solcher Partikel zu finden. Letztlich wurde die in 3.1.3 beschriebene *Colloidal Probe*-Technik angewendet.

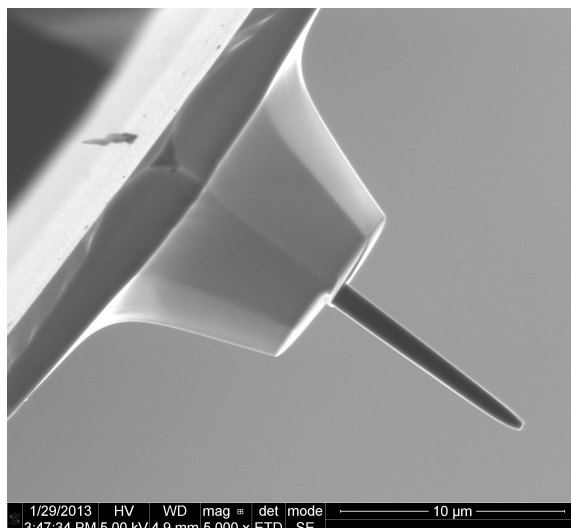


Abbildung 5.11: Mit FIB zugeschnittene Spitze eines Cantilevers.

Für diese AFM-Experimente wurden, wie schon erwähnt, Polymersome aus BCs mit 17 MOXA-Wiederholungseinheiten verwendet, welche als Standard in allen weiteren Experimenten zu sehen sind. Sie besitzen ein ζ -Potential von +28 mV. Pro modifiziertem Cantilever (CTAB, PEG bzw Citrat; vergleiche Abschnitt 3.1.3) wurde von 20 gespreiteten Polymersomen Kraft-Abstands-Kurven extrahiert (siehe Abbildung 5.12).

Die dreimal 20 FD-Kurven wurden jeweils gemittelt. Eine Überlagerung der drei resultierenden Kurven, ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass zwischen dem Citrat-modifizierten Cantilever und Polymersomen attraktive Wechselwirkungen vorherrschten, wohingegen sich der CTAB-modifizierte Cantilever und Polymersome abstießen. Der PEG-modifizierte Cantilever zeigte minimale Attraktion. Dabei ist anzumerken, dass die Wechselwirkungen nur schwache elektrostatische Wechselwirkungen sein können, da starke elektrostatische Wechselwirkungen eine deutlich weitere Reichweite (mehrere hundert nm) zeigen würden [81].

Die Versuche wurden mit einem zweiten Satz identisch modifizierter Cantilever wie-

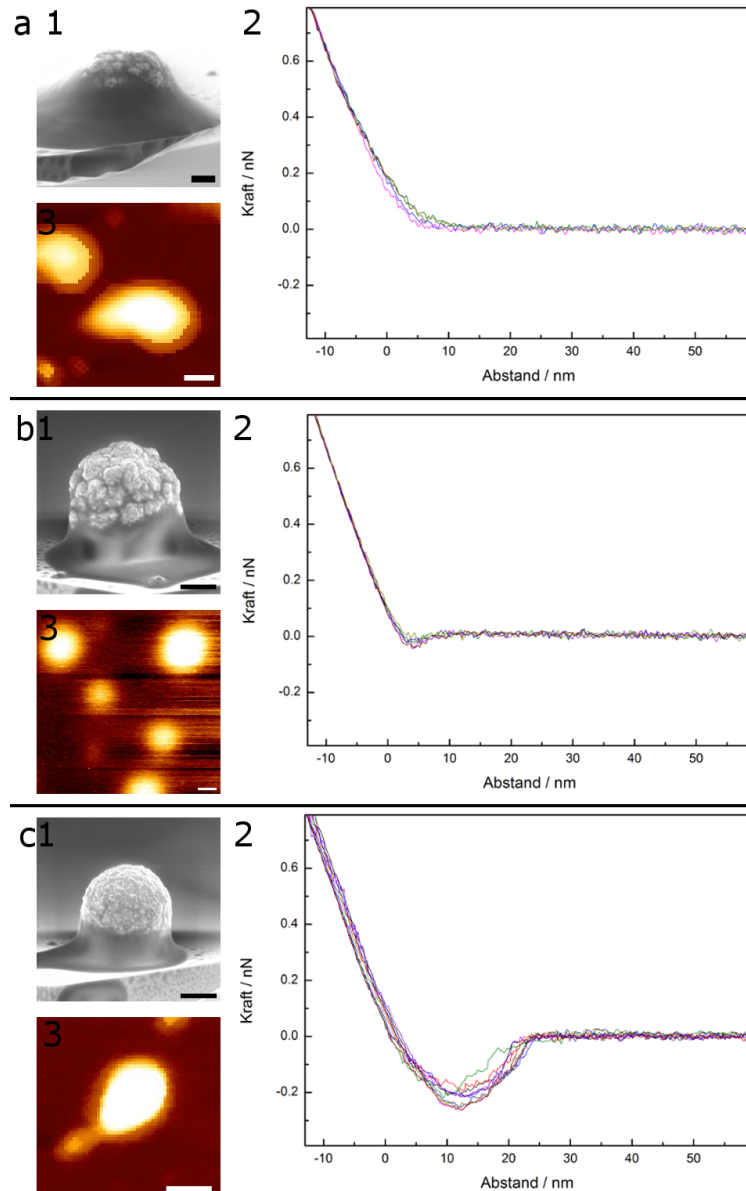


Abbildung 5.12: Abbildung der für die *Colloidal Probe*-Technik modifizieren Cantilever (a 1 - c 1), entsprechenden Höhenprofil (a 3 - c 3) und eine Überlagerung aller erhaltenen Kraft-Abstands-Kurven (a 2 - c 2).

derholt. Ein Vergleich der Kraft-Abstands-Kurven beider Sätze zeigte, dass jeweils alle drei Szenarien deutlich erkennbar sind (siehe Abbildung 5.14). Allerdings ist ein unterschiedlicher Verlauf der FD-Kurven zu beobachten. Dies kann auf die Topographie der verwendeten Partikel zurückgeführt werden. Betrachtet man z.B. die Abbildungen 5.12 b1 und c1, so ist zu erkennen, dass die Partikel stark unterschiedliche

Topographien besitzen. Es ist gut vorstellbar, dass eine so unterschiedliche Topographie bei identischer Modifizierung den veränderten Verlauf der FD-Kurven hervorrief. Dies bedeutet aber auch, dass keine quantitative Aussage über die Größe der Wechselwirkungen getroffen werden kann.

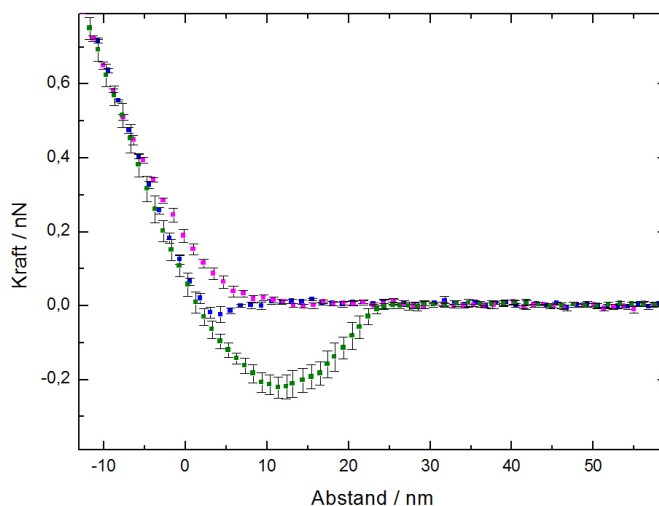


Abbildung 5.13: Überlagerung der drei gemittelten Kraft-Abstands-Kurven: CTAB- (magenta), PEG- (blau) und Citrat-modifiziert (grün) inklusive Fehlerbalken.

Die Abbildungen 5.12-5.14 zeigen, dass die Steigung aller Kraft-Abstands-Kurven annähernd identisch sind. Wie in Abschnitt 5.1.4 dargestellt, werden aus der Steigung der FD-Kurven und dem Höhenprofil des Polymersomes dessen physikalische Eigenschaften bestimmt. Bei der Bestimmung der physikalischen Eigenschaften in Abschnitt 5.1.4 wurden mit einem Siliciumnitrid-Cantilever gearbeitet. Es stellt sich nun die Frage, ob auch der Cantilever der *Colloidal Probe*-Technik verwendet werden kann, um die physikalischen Eigenschaften der Polymersome zu bestimmen. Deshalb wurde exemplarisch die Steigung einer FD-Kurve einer Messung mit Citrat-modifizierten Cantilever gefittet und daraus die Steifheit $k_{mem}=0,060\text{ N/m}$ des entsprechenden Polymersoms gewonnen. Mit der Breite $W=297\text{ nm}$ und Höhe $H=63\text{ nm}$

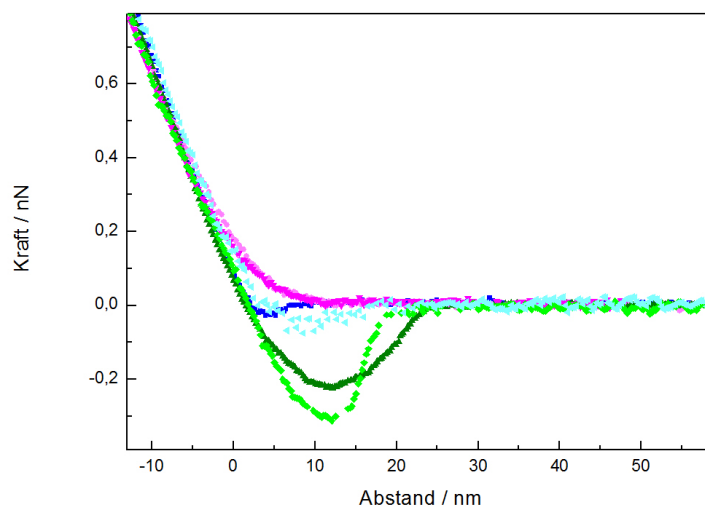


Abbildung 5.14: Überlagerung der gemittelten FDs aus 5.13 mit den FDs aus der Wiederholung des selbigen Experiments, wobei die entsprechenden Kurven von CTAB (magenta bzw. hellmagenta), PEG (blau bzw. hellblau) und Citrat (grün bzw. hellgrün) gleiches Adhäsionsverhalten zeigen.

wurden der Elastizitätsmodul $E=13,82\text{ MPa}$ und der Biegemodul $\kappa_B=33,73\ 10^{-19}\text{ J}$ berechnet. Diese Werte liegen im Bereich der Werte aus Abschnitt 5.1.4 (vergleiche Tabelle 5.2), wodurch bestätigt wurde, dass auch der Cantilever der *Colloidal Probe*-Technik dazu verwendet werden kann, um die physikalischen Eigenschaften der Polymersome zu bestimmen.

Die mit *Colloidal Probe*-Technik erarbeitete Methode, mit modifizierten Partikeln Polymersome zu analysieren, ist einerseits dazu geeignet, die Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und dem Polymersom abzuschätzen, andererseits können aus diesem Experiment die physikalischen Eigenschaften der Polymersome extrahiert werden. Mit einem Experiment können zwei Informationen gleichzeitig gewonnen werden, die für den transmembranen Transport von großer Bedeutung sind.

Welche Szenarien ergeben sich, wenn Polymersomen mit Nanopartikeln gemischt werden, die identisch modifiziert wurden wie die Spitzen der Cantilever in der *Colloidal*

Probe-Methode? Dieser Frage wird im nächsten Abschnitt nachgegangen.

5.2.2 Interaktion verschieden modifizierter Nanopartikel mit Polymersomen

Mit dem Wissen aus den AFM-Experimenten, dass unterschiedlich modifizierte Partikel unterschiedliche Wechselwirkungen zeigten, wurden in diesem Abschnitt Gold-Nanopartikel (Au-NPs) in derselben Art und Weise wie die Cantilever in der *Colloidal Probe*-Methode im vorhergehenden Abschnitt modifiziert. Nach der Charakterisierung der NPs wurden diese mit Polymersomen gemischt und die verschiedenen Szenarien mittels Cryo-TEM und PCS analysiert.

Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel

Die im folgenden Unterkapitel dargestellten Resultate wurden in der Publikation *Surface Asymmetry of Coated Spherical Nanoparticles* [142] veröffentlicht. Die verwendeten Citrat-Gold-Nanopartikel (Citrat-Au-NPs) wurden mittels hochauflösender TEM (HR-TEM), TEM sowie mit ζ -Potential-Messungen analysiert.

TEM-Analysen ergaben, dass die Partikel einen Durchmesser von 44 ± 4 nm besaßen (Abbildung 5.15 a), b)). Somit lag das theoretisch optimale Radienverhältnis von Nanopartikel zu Polymersom von etwa 1:6 vor. Die intrinsische Kristallinität der Au-NPs ist in Abbildung 5.15 c) gezeigt.

Die Citrat-Partikel wurden mit CTAB und PEG modifiziert (Sebastian Harms, Universität Mainz) und mit ζ -Potential-Messungen gezeigt, dass die Partikel positiv (CTAB-modifiziert), leicht negativ (PEG-modifiziert) und stark negativ (Citrat-modifiziert) geladen waren (vergleiche Tabelle 5.3).

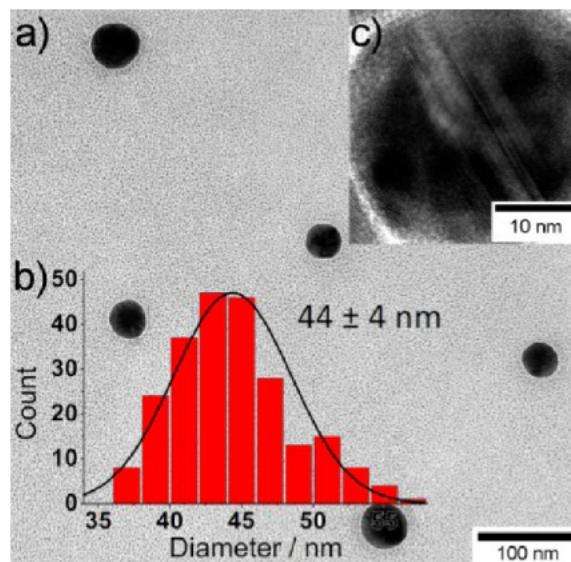


Abbildung 5.15: TEM Aufnahme von Citrat-Au-NPs (a) mit entsprechender Größenverteilung (b) und HR-TEM Abbildung in der die intrinsische Kristallinität zu sehen ist (c) [142].

Tabelle 5.3: ζ -Potentiale der verwendeten Au-NPs.

Probe	ζ -Potential / mV
Citrat-Au-NPs	-29
PEG-Au-NPs	-2
CTAB-Au-NPs	+54

Diese Partikel wurden jeweils mit Polymersomen aus BCs mit 17 MOXA-Wiederholungseinheiten gemischt und mittels Cryo-TEM und PCS analysiert.

Cryo-TEM-Betrachtungen

In den Cryo-TEM-Abbildungen zeigten die drei unterschiedlich modifizierten Partikel drei unterschiedliche Szenarien. Die positiv geladenen, CTAB-modifizierten Gold-Nanopartikel (CTAB-Au-NPs), welche in den AFM-Messungen repulsive Wechselwirkungen zeigten, waren unabhängig von den Partikeln zu finden. CTAB-Au-NPs und Polymersome koexistierten also (siehe Abbildung 5.16 a) und b)). Die PEG-Au-NPs, welche ein leicht negatives ζ -Potential besaßen und in den AFM-Experimenten

minimale Attraktion zeigten, waren in Cryo-TEM-Abbildungen zusammen mit den Polymersomen zu beobachten (siehe Abbildung 5.16 c)). Dabei waren die NPs an die Membran angelagert, verformten diese, wurden aber nicht aufgenommen. Im Fall der stark negativ geladenen Citrat-Au-NPs, welche in den AFM-Messungen deutlich attraktive Wechselwirkung zeigten, war Partikelaufnahme zu beobachten. So wurden die NPs komplett von der Membran der Polymersome umschlossen (siehe Abbildung 5.16 d) - f)).

Citrat-Au-NPs aus einem anderen Ansatz mit einem Durchmesser von 41 nm zeigten identisches Verhalten und wurden ebenfalls von den Polymersomen aufgenommen (siehe Abbildung 5.17).

Parallel zu den Cryo-TEM-Messungen wurden von Amelie Koch PCS-Messungen an identischen NP-Polymersom-Mischungen durchgeführt. Dabei wurde die intrinsische Kristallinität (siehe oben) der NPs ausgenutzt. Wegen dieser intrinsischen Kristallinität konnte polarisierte und unpolarisierte Lichtstreuung gemessen werden, was zur Folge hatte, dass mit nur einem Versuchsaufbau die NPs und die Polymersome gesondert detektiert werden konnten. Dadurch konnten dieselben Szenarien herausgearbeitet werden, die in den Cryo-TEM-Abbildungen oben gezeigt wurden. Zusätzlich konnte unterschieden werden, ob die aufgenommenen Citrat-Au-NPs frei im Inneren diffundierten, oder nach Aufnahme in die Membran der Polymersome eingelagert war, wobei laut PCS letzteres Szenario der Fall war. Detaillierte Ausführungen sind in der Publikation *Endocytosis in Polymersomes: Interactions of Gold Nanospheres with Polymeric Membranes* [159] oder der Dissertation von Amelie Koch zu finden [148].

Wie erwähnt zeigten PCS-Messungen, dass die NPs nach Aufnahme in der Membran eingelagert waren. Aus den Cryo-TEM-Abbildungen 5.16 d) und e) sowie 5.17 b) und d) könnte gefolgert werden, dass die Partikel nicht an der Membran hafteten. Die Abbildungen 5.16 f), 5.17 a) und c) sowie 5.18 a) und b) zeigen jedoch, dass die

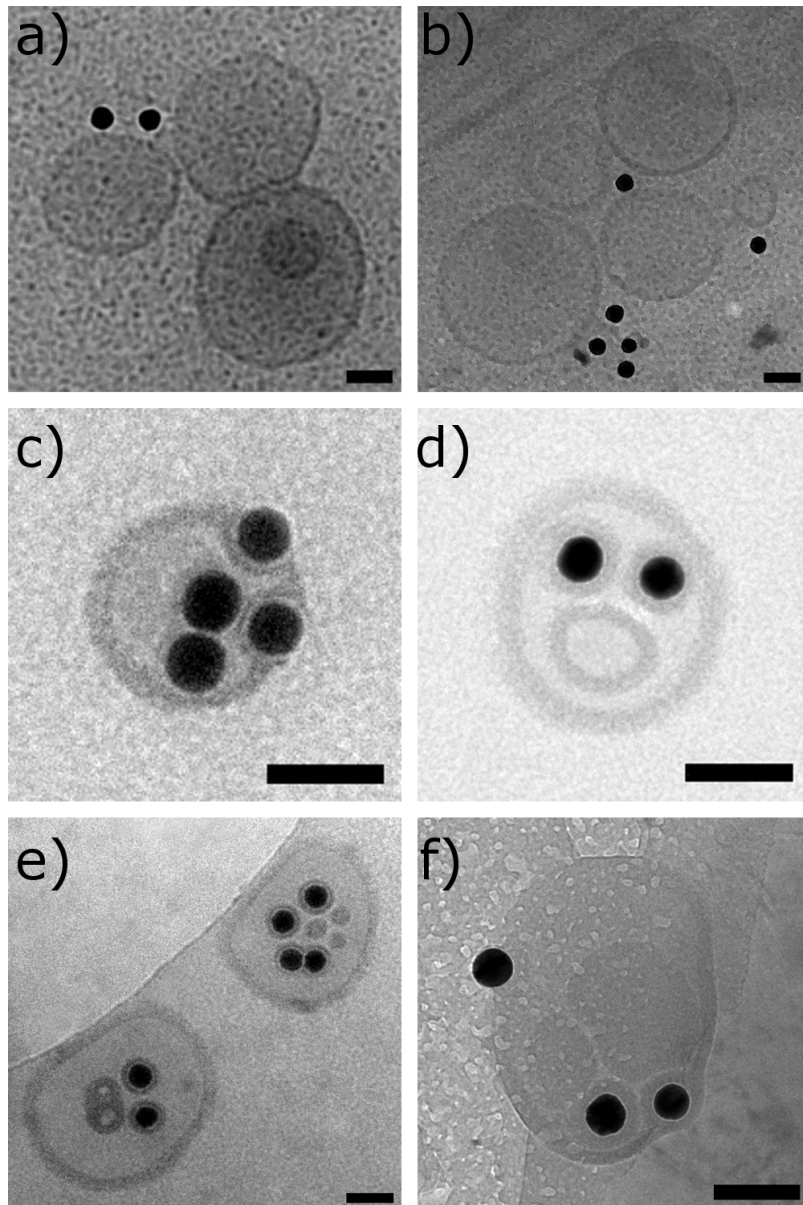


Abbildung 5.16: Cryo-TEM-Aufnahmen verschiedener Au-NPs, gemischt mit Polymersomen zeigen keine Interaktion für CTAB-Au-NPs (a, b), Anlagerung für PEG-Au-NPs (c) und Aufnahme für Citrat-Au-NPs (d-f).

Partikel in die Membran eingelagert waren. Ein entsprechendes theoretisches Modell wurde von Balazs et al. [107] publiziert (vergleiche Abschnitt 2.4.3). Die Partikel, die so aussehen, als würden sie nicht an der Membran haften, waren in die obere oder untere Polymersommembran eingelagert. Um dies einwandfrei nachweisen zu können, müsste Cryo-Tomographie durchgeführt werden. Hierfür ist jedoch die Konzentrati-

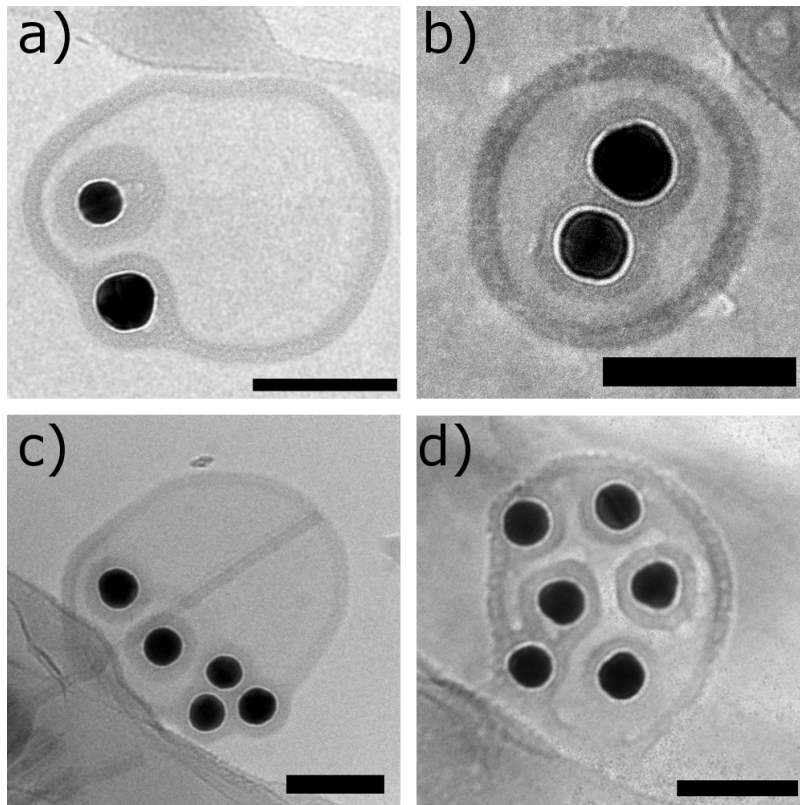


Abbildung 5.17: Cryo-TEM-Aufnahmen in Polymersome aufgenommenem Citrat-Au-NPs.

on der verwendeten Polymersom-Dispersion zu gering. Ein nötiges Aufkonzentrieren war, wie in Abschnitt 5.1.3 schon diskutiert, nicht möglich.

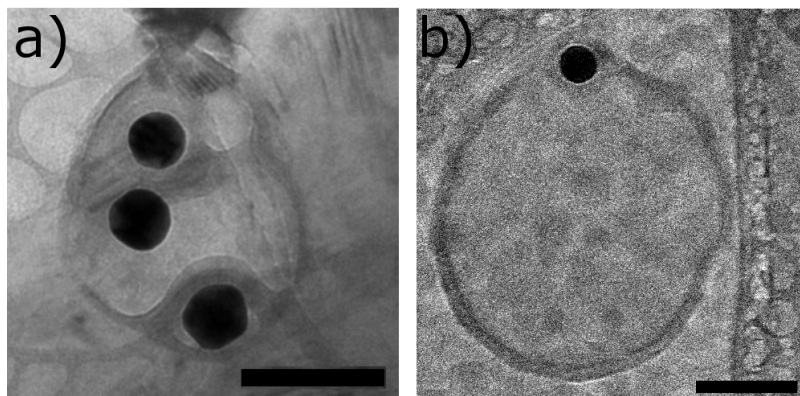


Abbildung 5.18: Cryo-TEM-Abbildungen, die die Aufnahme und Einlagerung von Citrat-Au-NPs mit einem Durchmesser von 41 nm (a) bzw. 44 nm (b) in die Polymersommembran zeigen.

Freie Partikel in Cryo-TEM-Aufnahmen

PCS-Messungen zeigten des Weiteren, dass im Falle der Citrat-Au-NPs-Polymersommischungen, keine Partikel frei in der Lösung vorlagen [148]. In Cryo-TEM-Abbildungen war jedoch eine Vielzahl an *freien* Partikeln zu sehen (siehe Abbildung 5.19 a)). Um zu verifizieren, ob dies auf die Probenpräparation zurückzuführen war, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Eine zu den Cryo-TEM-Versuchen identische Dispersion aus Partikeln und Polymersomen wurde auf ein Trägernetz mit Kohlenstofffilm gegeben. Nach Trocknen wurde die Probe mit TEM analysiert. Es war um jeden Partikel/jede Gruppe von Partikeln ein sphärischer, dunkelgrauer Schatten zu sehen, welcher von den Polymersomen stammte, die beim Trocknen zerstört wurden (siehe Abbildung 5.19 b) - c)). Es ist zu folgern, dass in der Dispersion keine freien Partikel vorlagen. Freie Partikel im Cryo-TEM-Abbildungen waren somit auf die Probenpräparation zurückzuführen.

5.2.3 Energetische Betrachtungen der NP-Aufnahme

Interessante Simulationen wurden von Mingyang Hu und Markus Deserno (Department of Physics, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA 15213) durchgeführt. In diesen Simulationen wurden amphiphile Moleküle (Lipide) durch drei Kugeln simuliert, zwei hydrophobe und eine hydrophile (siehe Abbildung 5.20 a)). Die hydrophoben Regionen unterschiedlicher Lipide zeigten starke weitreichende attraktive Wechselwirkungen. Ebenso die hydrophilen Regionen unterschiedlicher Lipide, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen. Dadurch wurde gewährleistet, dass die simulierten Lipide sich analog zu natürlichen Lipiden verhalten. Folglich konnte ein Vesikel erstellt werden, dessen Dimension der in dieser Arbeit verwendeten Polymersome entsprach.

Diese Vesikel wurden mit Partikeln versetzt, wobei zwischen den Vesikeln und den

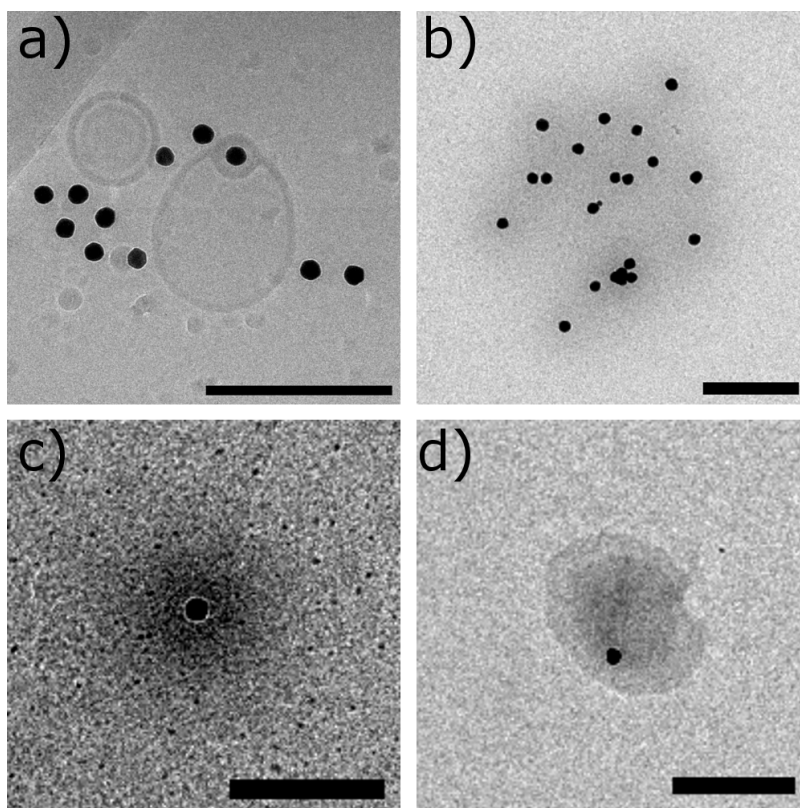


Abbildung 5.19: a) Cryo-TEM-Aufnahme einer NP-Polymersom-Mischung, bei der *freie* NPs zu sehen sind. b-d) TEM-Aufnahmen einer NP-Polymersom-Mischung, die auf einem Kohlefilm getrocknet wurde.

Partikeln attraktive, kurzreichweitige Wechselwirkungen vorherrschten. In einer Simulation wurde die Adhäsionsenergie betrachtet, die durch die attraktive Wechselwirkung zwischen Partikel und Vesikel bei Kontakt entsteht. Der zeitliche Verlauf der Adhäsionsenergie ist in Abbildung 5.20 b) dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich die Adhäsionsenergie sprunghaft ändert, wenn ein Partikel in Kontakt mit dem Vesikel tritt (= Adsorption). Nach der Adsorption wird der Partikel von der Vesikel-Membran aufgrund der attraktiven Wechselwirkung umwickelt, wodurch kontinuierlich Adhäsionsenergie entsteht, bis der Partikel komplett vom Vesikel aufgenommen ist [78].

Welche Informationen können daraus auf die experimentellen Befunde übertragen werden? Im Folgenden wird das Verhalten der drei verschiedenen NP-Typen (CTAB-, PEG-, bzw Citrat-modifiziert), bezogen auf die Simulationen, analysiert.

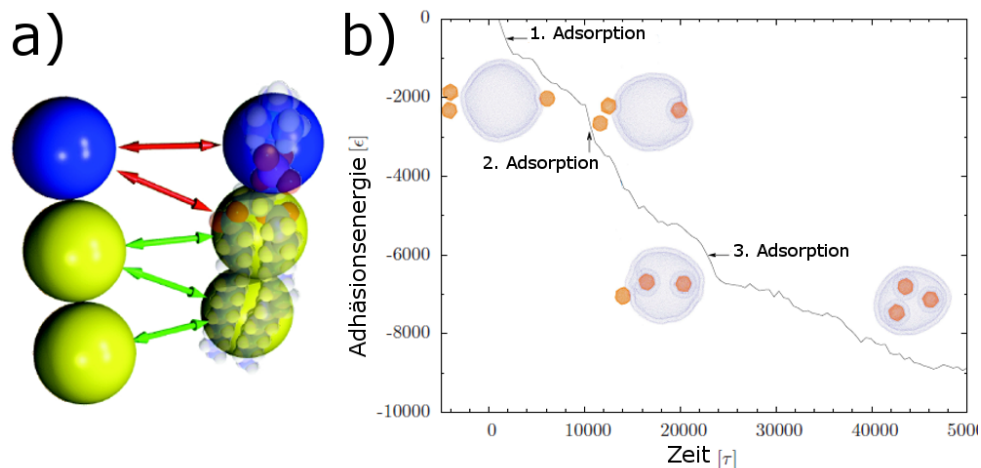


Abbildung 5.20: a) Schematischer Aufbau der zur Simulation verwendeten amphiphilen Moleküle. b) Verlauf der Adhäsionsenergie beim Anlagern mehrerer Partikel

Da die CTAB-Au-NPs mit den Polymersomen keine attraktiven Wechselwirkungen zeigten, wie mit den AFM-Messungen gezeigt wurde, werden diese nicht weiter diskutiert.

Die PEG-Au-NPs zeigten Anlagerung an die Polymersome. Somit lagen attraktive Wechselwirkungen zwischen den NPs und den Polymersomen vor, was auch durch die AFM-Messungen bestätigt wurde (siehe Abschnitt 5.2.1). Auf der entsprechenden Cryo-TEM-Aufnahme (Abbildung 5.16 c)) ist zu sehen, dass die Membran leicht verformt ist. Das Verformen der Membran bedarf Energie. Je stärker die Membran verformt wird (gedehnt bzw. zusammengedrückt), desto mehr Energie muss aufgewendet werden (siehe Abschnitt 2.4). Diese Energie kann nur durch die Attraktion zwischen NP und Polymersom gewonnen werden (= Adhäsionsenergie). Der Energiegewinn der Adsorption reicht, um die Membran, wie beobachtet, signifikant zu verformen. Ein weiteres Einwickeln des NPs fordert mehr Verformung der Membran, also mehr Energie. Da dies jedoch nicht auftritt ist zu folgern, dass die Wechselwirkung zwischen NP und Vesikel zu schwach sind, als dass sich die Membran weiter Verformen kann.

Im Falle der Citrat-Au-NPs liegen deutlich stärkere attraktive Wechselwirkungen zwischen NP und Polymersom vor als bei den PEG-modifizierten Au-NPs (vergleiche AFM-Messungen in Abschnitt 5.2.1). Diese attraktive Wechselwirkung ist so groß, dass nach der Adsorption der NPs genug Adhäsionsenergie gewonnen wird, um die Membran weiter zu verformen bis der Partikel komplett aufgenommen ist. In den entsprechenden Cryo-TEM-Abbildungen ist die Aufnahme der NPs zu beobachten (vergleiche Abbildung 5.16 d-f).

Die vorausgehenden Ausführungen zeigten, dass sich die experimentellen Befunde mit Computersimulationen erklären lassen. Es konnte das Verhalten unterschiedlich modifizierter NPs durch die Simulation der Adhäsionsenergie, die sich aus den attraktiven Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Vesikeln ergab, erklärt werden.

5.2.4 Molekulares Verhalten der BCs in der Membran

Bei Zellen und Vesikeln ist bekannt, dass sich die Membran aus einer Lipiddoppelschicht zusammensetzt [22]. Aber wie ordnen sich die BCs in der Polymersommembran an? Wie sieht der molekulare Aufbau der Membran aus, wenn ein Partikel in der Membran verankert ist wie z.B. in Abbildung 5.17 a)? Diesen Fragen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

Die SAXS-Messungen ergaben, unabhängig von der Länge des PMOXA-Blocks, eine konstante Membrandicke. Deshalb wird angenommen, dass eine innere PDMS-Schicht und zwei äußere PMOXA-Schichten vorliegen. Mögliche Szenarien der Anordnung der BCs sind in Abbildung 5.21 dargestellt: a) die BCs bilden, analog zu Lipiden, eine Doppelschicht, b) die BCs sind so weit gestreckt, dass sie die ganze Schale überspannen oder c) die BCs sind gekippt und somit noch weiter gestreckt.

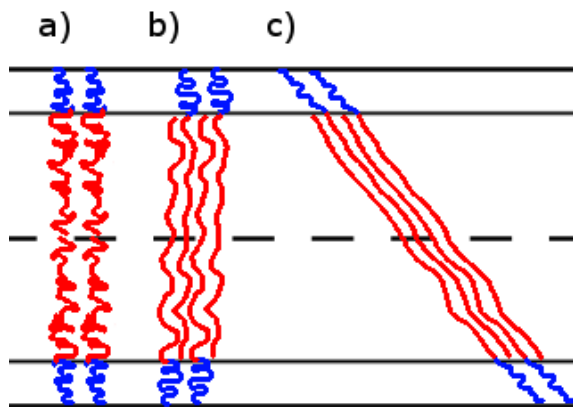


Abbildung 5.21: Verschiedene schematische Besetzungen der Membran durch die Blockcopolymere.

Um eine Idee zu bekommen, welches der drei Szenarien am wahrscheinlichsten vorliegt, werden folgende Betrachtungen herangezogen: Das eine Extrem ist das freie Polymer. Der mittlere Gyrationradius $\langle S \rangle$ einer freien PDMS-Kette mit der molaren Masse M kann mit:

$$\frac{\langle S \rangle}{M} = 7,78 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^2 \quad (5.1)$$

berechnet werden [160]. Das verwendete PDMS hat eine molare Masse von 5000 g/mol und somit einen mittleren Gyrationradius von 1,9 nm. Das andere, wenn auch nur theoretisch realisierbare Extrem ist das komplett gestreckte Molekül. Unter Annahme der in der Literatur angegebenen Länge der Atombindungen [161] und einem 120° -Winkel erhält man für dieses PDMS eine maximale Länge von 22,2 nm. Da die Membran einen Durchmesser von 16 nm besitzt, sind alle drei Szenarien theoretisch möglich. Aus Sicht der Entropie ist Zustand a) am günstigsten, da hier das Polymer die meisten Freiheitsgrade besitzt. Die Zustände b) und c) können nur eintreten, wenn die Energie, die kompensiert werden muss, um die Polymere zu strecken, durch intramolekulare Wechselwirkungen gewonnen wird. Da PDMS einen Dipol von $\pm 0,6 D$ besitzt, sind sowohl Dipol-Dipol-, als auch hydrophobe Wechselwirkungen denkbar. Es ist anzunehmen, dass die Membran umso steifer wäre, je mehr intramolekulare Wechselwirkungen vorliegen. Da die vorliegende Membran für ein Polymersom je-

doch einen relativ kleinen Elastizitätsmodul besitzt, ist anzunehmen, dass die BCs sich vorrangig entsprechend der Situation a) in Abbildung 5.21 anordnen.

Wird nun ein Nanopartikel, der komplett von einer polymeren Doppelschicht umgeben ist, in die Membran des Polymersoms eingelagert (analog zu Abbildung 5.17 a, unterer NP), entsteht das in Abbildung 5.22 gezeigte Schema. Dabei ist festzustellen, dass zwei Doppelschichten aufeinandertreffen (rot umrandet).

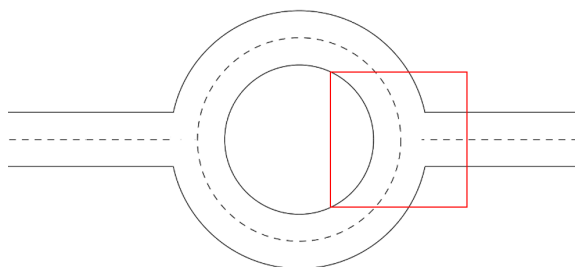


Abbildung 5.22: Schematische Darstellung der Einlagerung eines von einer Doppelschicht umgebenen NPs in die Membran eines Polymersoms.

Besetzt man die Doppelschichten schematisch mit BCs (siehe Abbildung 5.23), stößt man dort, wo sich die beiden Doppelschichten treffen, auf das Problem, dass ein Bereich nicht leicht zu besetzen ist (grün hinterlegt in Abbildung 5.23 b). Außerdem liegt ein Bereich vor, in dem eine sehr hohe Krümmung der Membran zu finden ist, was zur Folge hat, dass dort Kopfgruppen der BCs sterisch unvorteilhaft angeordnet sind (blau hinterlegt in Abbildung 5.23 b).

Das bisher betrachtete Schema war eine einfache Darstellung des in die Membran eingelagerten NPs. Passt man das Schema den Ergebnissen aus den Cryo-TEM-Messungen an (siehe Abbildung 5.24) und besetzt die Membran schematisch, ist wiederum eine Fläche frei (grün hinterlegt in Abbildung 5.24 b), welche als Defekt zu sehen ist. Diese muss durch Strecken der vorhandenen BCs besetzt werden. Die dafür notwendige Energie kann durch die positiven Wechselwirkungen zwischen Mem-

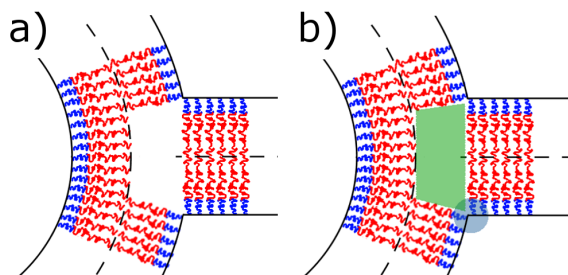


Abbildung 5.23: a) Schematische Besetzung der Doppelschichten mit BCs; b) Probleme bei der schematischen Besetzung der Doppelschicht mit BCs, durch Auftreten von Lücken (grün hinterlegt) und Bereichen hoher Membrankrümmung (blau hinterlegt).

bran und Partikel gewonnen werden (vergleiche Abschnitt 5.2.3).

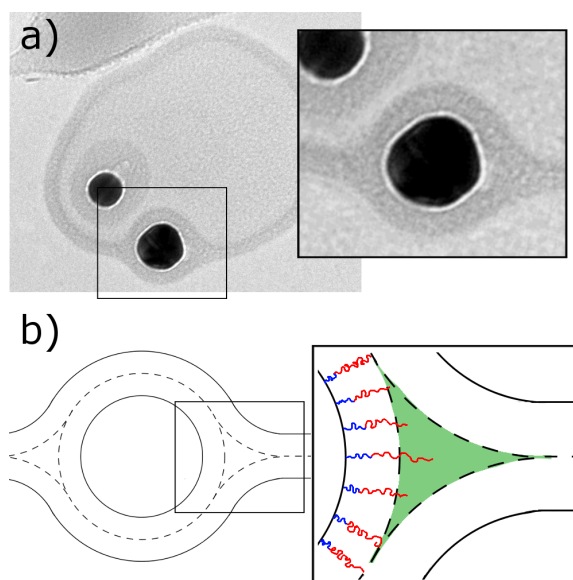


Abbildung 5.24: a) Zum besseren Verständnis gedrehte Cryo-TEM-Abbildung 5.17 mit Vergrößerung im Einschub; b) Schematischer Verlauf der Doppelschicht und dessen Besetzungen mit BCs und dem entstandenen Defekt (grün hinterlegt) im Einschub.

Da das Besetzen der Fläche nur durch Strecken der vorhandenen Moleküle stattfinden kann, wäre theoretisch eine verringerte Dichte in dieser Region zu erwarten. Dies kann mit Cryo-TEM-Messungen nicht bestätigt werden, da die Auflösung des verwendeten Cryo-Transmissionselektronenmikroskops zu gering ist.

Betrachtet man Abbildung 5.17 c) (vergrößert in Abbildung 5.25 a) dargestellt) und zeichnet das Szenario schematisch nach (siehe Abbildung 5.25 b)), ist der in Abbildung 5.24 b) beschriebene Defekt (grüne Fläche) sechs mal zu finden. Woher kommt die dafür notwendige Energie? Einerseits ist eine Erklärung durch den Aufnahmeprozess denkbar. Ist ein Partikel aufgenommen und in der Membran verankert, liegt in dessen Nähe eine Region vor, die schon gekrümmt ist (siehe z.B. Abbildung 5.24). Lagert sich in dieser Region ein weiterer Partikel an, wird beim Anlagern auf einmal viel mehr Adhäsionsenergie frei, als beim Anlagern an eine freie Membran, da mehr Kontaktfläche vorliegt. Es wird also viel Adhäsionsenergie gewonnen, ohne Energie für die Verformung der Membran aufwenden zu müssen. Ein weitere Erklärung kann beim genaueren Betrachten der Abbildung 5.17 c) (bzw. 5.25 a) gefunden werden. Es ist festzustellen, dass der Abstand zwischen den Partikeln mit ca. 10 nm kleiner ist als die durchschnittliche Dicke der Polymersommembran mit 16 nm. Die Partikel nähern sich also weiter an, wodurch die Defektflächen (grün dargestellt in Abbildung 5.25 b)) verringert werden und die BCs weniger gestreckt werden müssen, um diese Fläche zu besetzen. Dies bedeutet wiederum, dass weniger Energie aufgewendet werden muss.

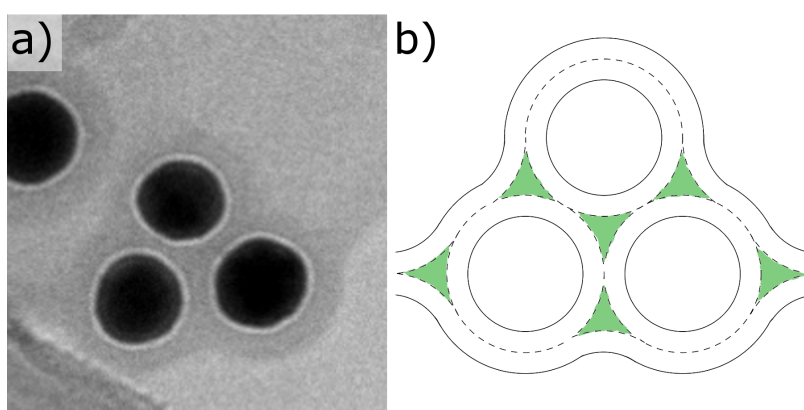


Abbildung 5.25: a) Vergrößerung der Cryo-TEM-Abbildung 5.17 c). b) Entsprechender schematischer Verlauf der Membran.

Auch zu Defekten in der Membran wurden Simulationen an dem in Abschnitt 5.2.3 eingeführten Vesikel-System durchgeführt (Mingyang Hu und Markus Deserno). Es wurde beobachtet, dass Partikel nicht nur einzeln aufgenommen werden, sondern auch Szenarien vorliegen, in denen zwei oder drei Partikel zusammengelagert sind und sich teilweise eine Doppelschicht teilen (siehe exemplarisch für zwei Partikel Abbildung 5.26). Wie beim Einlagern eines von einer Doppelschicht umgebenen Partikels in der Membran (vergleiche Abbildung 5.22), treffen zwei Doppelschichten aufeinander, was wie oben gezeigt zu Defekten führt (rot umrandet in Abbildung 5.26).

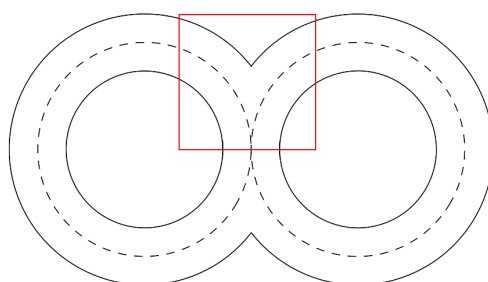


Abbildung 5.26: Schematische Darstellung des Verlaufs der Membran, wenn sich zwei NPs teilweise eine Doppelschicht teilen.

In dieser Simulation wurde für einen NP, zwei und drei NPs die durchschnittliche Energie pro Lipid-Molekül der Doppelschicht berechnet (siehe Abbildung 5.27). Dabei wurde festgestellt, dass die Energie pro Molekül deutlich erhöht ist, wenn sich zwei NPs teilweise eine Doppelschicht teilen. Dies ist auf die in Abbildung 5.26 gezeigten Defekte zurückzuführen, die von den Lipiden durch Strecken oder Umlagern kompensiert werden müssen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Gesamtenergie pro Lipid umso höher ist, je mehr Partikel zusammengelagert sind. Daraus lässt sich erklären, warum NPs vorrangig einzeln aufgenommen werden.

In diesem Abschnitt konnte aus Cryo-TEM-Abbildungen ein molekulares Verständnis der Membran entwickelt werden, welches durch Computersimulationen bestätigt wurde.

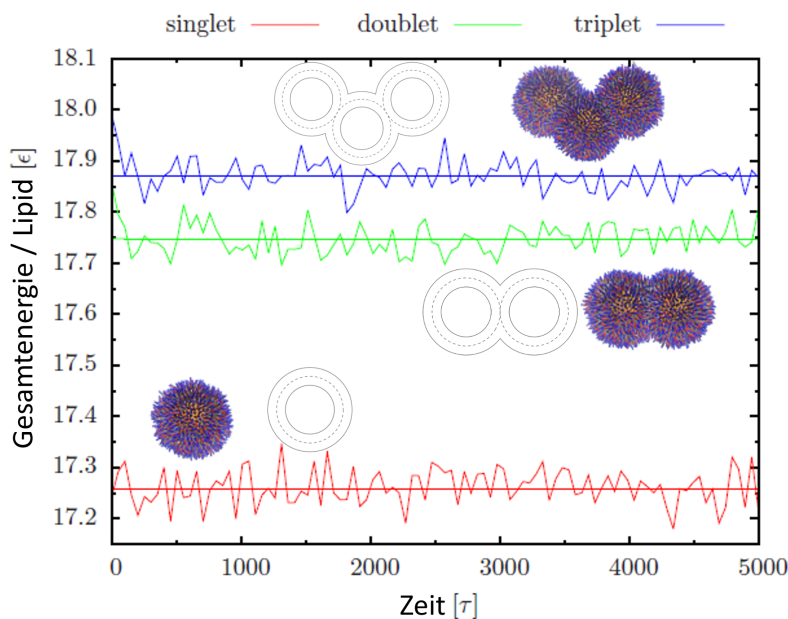


Abbildung 5.27: Berechnete Gesamtenergie pro Membranmolekül für einzelne NPs und Zusammenlagerung von 2 bzw. 3 NPs.

5.2.5 Einfluss der Form der Nanopartikel auf die Aufnahme in Polymersome

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass nur hinreichend negativ geladene Nanopartikel Aufnahme in Polymersome zeigten. Um den Einfluss der Form eines Partikels auf die Aufnahme zu analysieren, wurden Gold-Nanostäbchen (Gold-Nanorods, Au-NRs) mit verschiedenen Seitenverhältnissen (2,9-4,2) verwendet (siehe TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.28). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Breite der NRs möglichst konstant ist und das Volumen der NRs vergleichbar zu dem der NPs aus Abschnitt 5.2.2 war. Bei den Experimenten sollte auch herausgefunden werden, ob ein maximales Seitenverhältnis vorliegt, bis zu dem NRs aufgenommen werden. Alle NRs wurden mit 11-Mercaptoundecansäure (MUA), wie in Abschnitt 5.28 beschrieben, modifiziert und deren ζ -Potential bestimmt (siehe in Tabelle 5.4).

Sowohl PCS (Wird in der Dissertation von A. Koch genauer diskutiert [148]), als auch

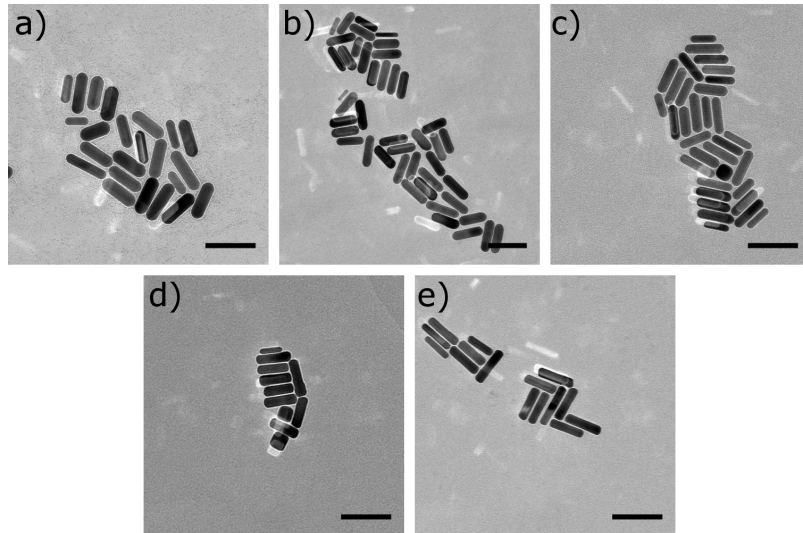


Abbildung 5.28: TEM-Aufnahmen der verwendeten Au-NRs 700 (a), 750 (b), 780 (c), 808 (d) und 850 (e). Die Balkenskala beträgt 100 nm.

Tabelle 5.4: ζ -Potentiale der verwendeten MUA-Au-NRs.

Probe	Länge / nm	Breite / nm	Seitenverhältnis	ζ -Potential / mV
700	$68,2 \pm 10,0$	$23,3 \pm 4,5$	2,9	-12
750	$73,7 \pm 8,3$	$22,9 \pm 2,8$	3,2	-15
780	$63,7 \pm 9,6$	$16,8 \pm 2,8$	3,8	-18
808	$67,1 \pm 8,6$	$17,6 \pm 2,8$	3,8	-20
850	$71,4 \pm 8,8$	$17,0 \pm 2,2$	4,2	-16

Cryo-TEM-Experimente zeigten, dass die Aufnahme aller verwendeten Nanostäbchen möglich war (siehe Abbildung 5.29). Es konnte somit kein maximales Seitenverhältnis gefunden werden, bis zu welchem NRs aufgenommen werden. NRs mit höherem Seitenverhältnis, aber der nötigen Breite waren nicht verfügbar. Es sei anzumerken, dass in Tabelle 5.4 die gemittelten Seitenverhältnisse von je 100 vermessenen NRs angegeben sind, wohingegen in der Abbildungen 5.29 das Seitenverhältnis des jeweils längsten, aufgenommenen NRs, angegeben ist.

Es stellt sich nun die Frage, wie die Aufnahme eines asymmetrischen Partikels ver-

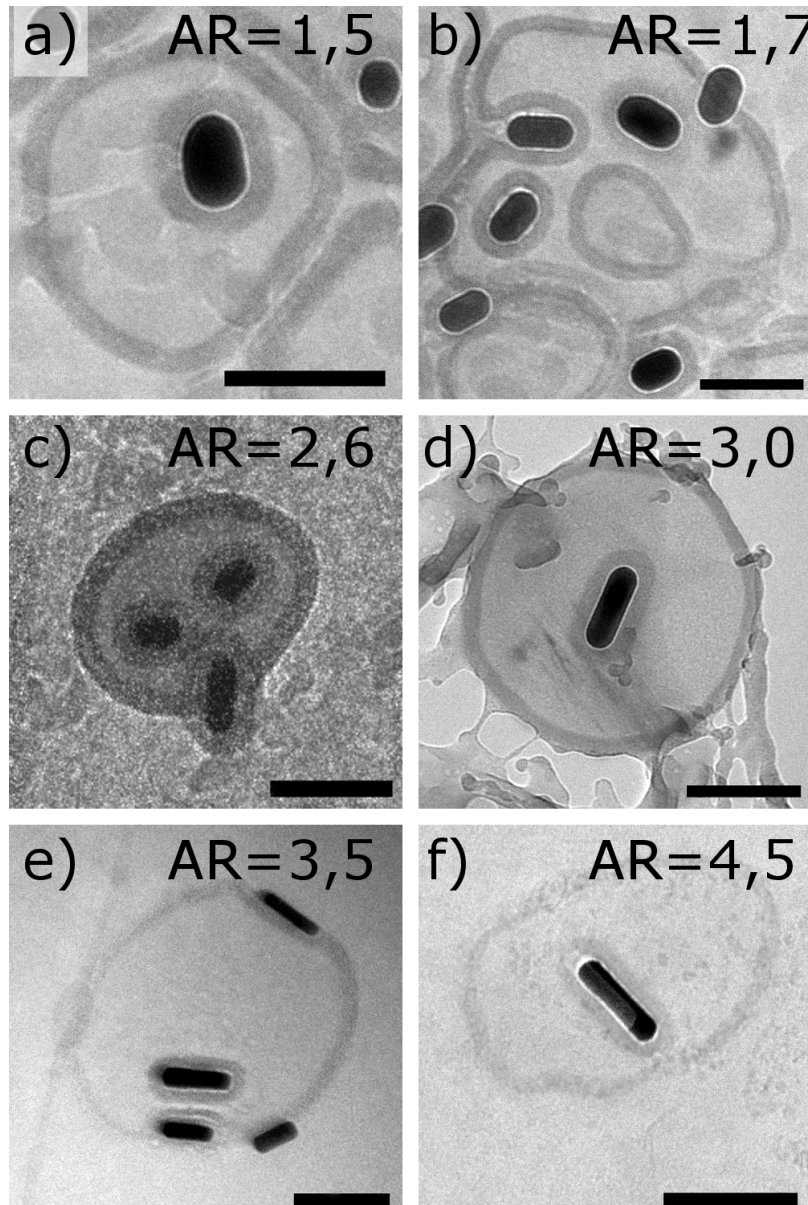


Abbildung 5.29: Cryo-TEM-Aufnahmen von in Polymersome aufgenommenen MUA-Au-NRs mit unterschiedlichen Seitenverhältnissen.

läuft. In der Literatur existieren zwei sich widersprechende Modelle zur Aufnahme von Nanostäbchen in Vesikel, die schon in Abschnitt 2.4.3 dargestellt wurden. Da der Aufnahmeprozess dynamisch ist, Cryo-TEM aber ein Abbild eines Momentes gibt, kann der Aufnahmeprozess nicht direkt verfolgt werden. Es können jedoch die verschiedenen Schritte der Aufnahme an unterschiedlichen Polymersomen beobachtet werden. So werden in Abbildung 5.30 Ausschnitte aus Cryo-TEM-Abbildungen mit

dem von Huang et al. postulierten *Hinlegen-und-Aufrichten*-Mechanismus verglichen.

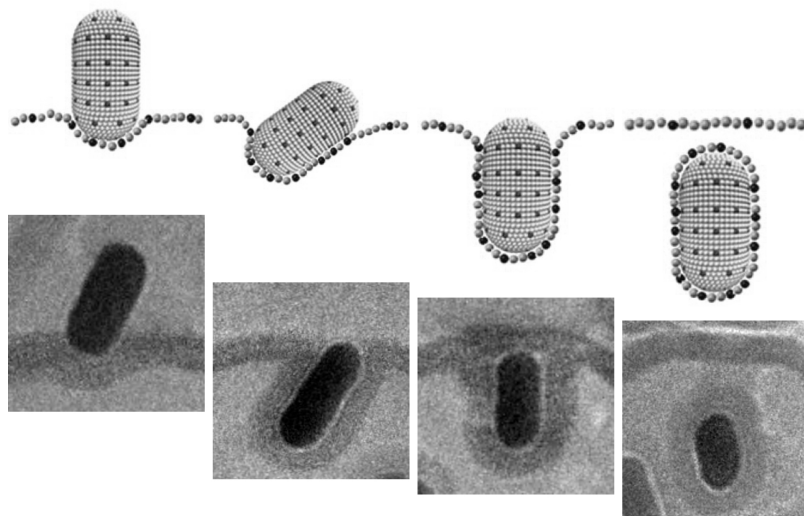


Abbildung 5.30: Vergleich des *Hinlegen-und-Aufrichten*-Mechanismus nach Huang et al. mit Ausschnitten aus Cryo-TEM-Aufnahmen.

Auch für die Aufnahme von vertikal, bzw. horizontal andockenden Nanostäbchen nach Yang et al. konnten Ausschnitte aus Cryo-TEM-Aufnahmen gefunden werden (siehe Abbildung 5.31).

Aus den gezeigten Cryo-TEM-Ausschnitten kann nicht gefolgert werden, welcher der beiden postulierten Mechanismen tatsächlich vorlag. Es ist allerdings zu vermuten, dass der von Huang et al. publizierte Mechanismus im vorliegenden System zumindest nicht ganz bis zum Ende stattfindet. Der letzte Schritt in Abbildung 5.30, das Abkapseln des aufgenommenen Nanostäbchens, ist mit PCS-Messungen auszuschließen, da keine freien Nanostäbchen in den Polymersomen zu beobachten waren [148]. Im entsprechenden Cryo-TEM-Ausschnitt kann das aufgenommene, vermeintlich freie, Nanostäbchen wiederum in die obere oder untere Polymersommembran eingelagert sein.

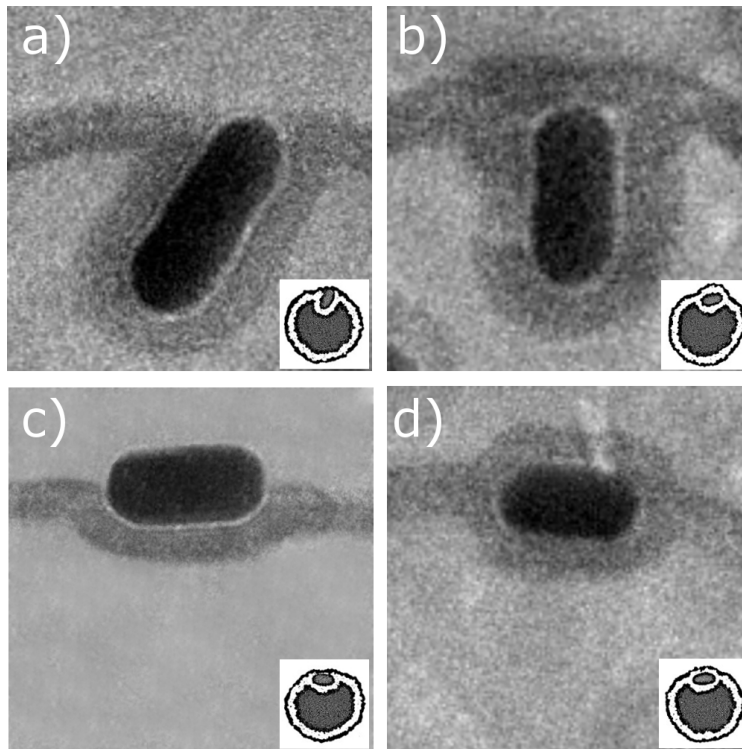


Abbildung 5.31: Cryo-TEM-Ausschnitte (a-d), die dem Modell (Einfügungen) von Yang et al. entsprechen.

5.3 Das Modellsystem der riesigen unilamellaren Vesikel

Nachdem die Aufnahme von NPs im Minimal-Modellsystem der Polymersome im Detail studiert wurde, sollen die Erkenntnisse auf ein natürliches System übertragen werden. Da die Polymersome jedoch hinsichtlich Größe, Membrandicke und Oberflächenladung weit vom natürlichen System (in diesem Fall Erythrozyten) entfernt sind, wurde ein Modellsystem aufgebaut, welches zwischen Polymersomen und Erythrozyten lag. Dazu wurden riesige unilamellare Vesikel (GUVs) hergestellt. Einen Vergleich der drei Systeme liefert Tabelle 5.5.

Nach einer kurzen Charakterisierung der GUVs und der verwendeten Partikel, werden in diesem Abschnitt die Resultate der Experimente verschieden modifizierter, 1 μm großer Partikel mit den GUVs dargestellt.

Tabelle 5.5: Vergleich von Polymersomen, GUVs und RBCs hinsichtlich Durchmesser D , ζ -Potential, Membrandicke h und Zusammensetzung.

	Polymersome	GUVs	RBCs
$D / \mu\text{m}$	0,25	5	5
ζ -Potential / mV	+28	-39	-15
h / nm	16	4-5	4-5
Zusammensetzung	BCs	Lipide (Egg-PC)	Lipide, Proteine, Enzyme + Cytoskelett

5.3.1 Charakterisierung der GUVs und der verwendeten Partikel

GUVs wurden mit Hilfe von cDICE (siehe Abschnitt 4.2.2) hergestellt. Aufgrund des verwendeten Lecithins (aus Eiweiß) zeigten die GUVs ein ζ -Potential von -39 mV. Abbildung 5.32 zeigt eine CLSM-Aufnahme der hergestellten GUVs, die mit *CellMask™ Deep Red* angefärbt worden war und 5-10 μm groß sind.

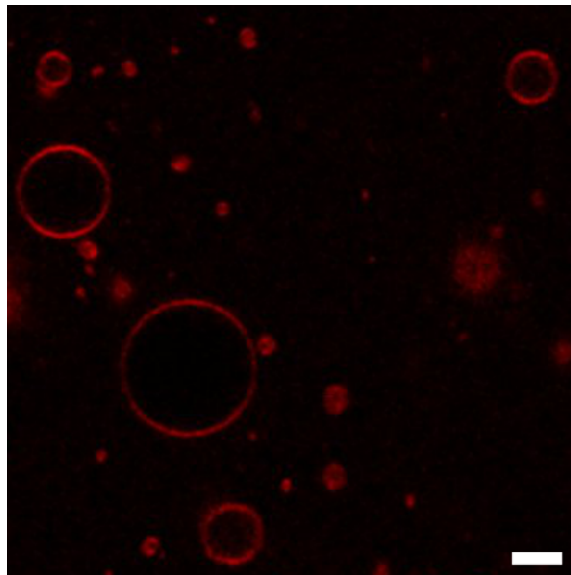


Abbildung 5.32: CLSM-Aufnahme von GUVs, die mit *CellMask™ Deep Red* angefärbt wurden. Die Balkenskala beträgt 5 μm .

Um das theoretisch postulierte und im Minimal-Modellsystem der Polymersome vorliegende Radienverhältnis von Partikel zu Vesikel von ca 1:6 zu wahren, wurden folgende 1 μm große Partikel (Mikropartikel, μPs) verwendet (vergleiche Tabelle 3.2): Carboxyl- und Amino-funktionalisierte sowie unmodifizierte Polystyrol-Mikropartikel (COOH-, NH_2 - bzw. plain-PS- μP ;; Fa. Kisker); Amino-funktionalisierte und unmodifizierte Siliciumdioxid-Mikropartikel (NH_2 - bzw. plain-SiO₂- μPs ; Fa. Kisker); N-(6-Amino-hexyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan-modifizierte Siliciumdioxid-Mikroartikel (AHAPS-SiO₂- μPs ; Ch. Goroncy, AK Graf, FU Berlin nach [144]). Von allen μPs wurde das ζ -Potential in wässrigem Medium gemessen (siehe Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Modifizierung, Material und ζ -Potentiale der verwendeten Partikel in Wasser.

Probenname	Modifizierung	Material	ζ -Potential / mV
NH_2 -PS- μPs	Amino-	Polystyrol	-23
plain-PS- μPs	-	Polystyrol	-29
COOH-PS- μPs	Carboxyl-	Polystyrol	-30
AHAPS-SiO ₂ - μPs	AHAPS	Siliciumdioxid	12
NH_2 -SiO ₂ - μPs	Amino-	Siliciumdioxid	3
plain-SiO ₂ - μPs	-	Siliciumdioxid	-48

Die NH_2 -SiO₂- μPs und die AHAPS-SiO₂- μPs zeigten positives ζ -Potential. Die Werte aller anderen Partikel lagen im negativen Bereich, was für die NH_2 -PS- μPs überraschend war. Da sowohl der Einfluss der Ladung, als auch der des zugrunde liegenden Materials analysiert werden sollte, wurden, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, die am schwächsten negativ geladenen NH_2 -PS- μPs mit den positiv geladenen Molekülen CTAB bzw. PolyDACMAC umgeladen, um auch positiv geladene Polystyrol-Mikropartikel vermessen zu können. Nach ein- bzw. dreimaligem Zentrifugieren wurde das ζ -Potential gemessen (siehe Tabelle 5.7). Es ist festzustellen, dass beide umgeladenen Partikel nach einmaligem Zentrifugieren deutlich positiv geladen waren. Nach dreimaligem Zentrifugieren lag das ζ -Potential der PolyDACMAC-PS- μPs -(3c) noch

leicht im Positiven, das der CTAB-PS- μ Ps-(3c) jedoch wieder stark im Negativen.

Tabelle 5.7: ζ -Potentiale der umgeladenen Partikel in wässrigem Medium.

Probe	Anzahl an Zentrifugieren	ζ -Potential / mV
CTAB-PS- μ Ps-(1c)	1	21
CTAB-PS- μ Ps-(3c)	3	-20
PolyDACMAC-PS- μ Ps-(1c)	1	29
PolyDACMAC-PS- μ Ps-(3c)	3	5

5.3.2 Interaktion verschiedener Mikropartikeln mit GUVs

Alle Mikropartikel, die im vorhergehenden Abschnitt eingeführt wurden, wurden mit fluoreszenzmarkierten GUVs gemischt (vergleiche Abschnitt 4.2.1) und mit Hilfe von CLSM analysiert.

Es war festzustellen, dass die negativ geladenen PS- μ Ps (COOH-, NH₂- und plain-PS- μ Ps) keinerlei Interaktion mit den GUVs zeigten und separat von den Vesikeln detektiert wurden. GUVs und die entsprechenden Mikropartikel koexistierten (siehe Abbildung 5.33). Bei den SiO₂- μ Ps zeigten die negativ geladenen plain-SiO₂- μ Ps ebenfalls keine Interaktion (siehe Abbildung 5.34 a) und b)). Dementgegen war bei den positiv geladenen SiO₂- μ Ps (NH₂- und AHAPS-SiO₂- μ Ps) zu beobachten, dass die Partikel von den GUVs angezogen wurden und zusammen beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 5.34 c) - f)).

Die umgeladenen Partikel zeigten ein unerwartetes Verhalten. Beide einmalig zentrifugierten, umgeladenen PS-Mikropartikel (CTAB- bzw. PolyDACMAC-PS- μ Ps-(1c)) waren an GUVs angelagert (siehe Abbildung 5.35 a) und c)). Allerdings waren

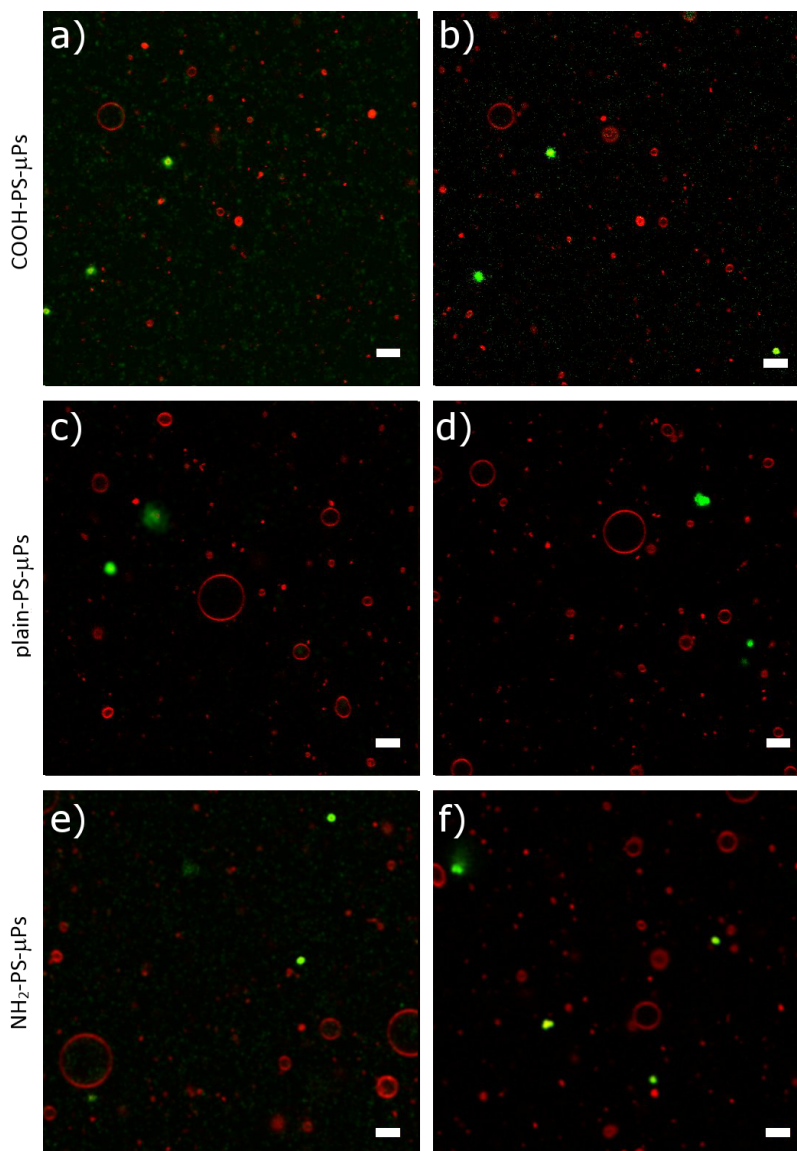


Abbildung 5.33: CLSM-Aufnahmen von Mischungen aus GU-VEs und verschiedenen PS- μ Ps: NH_2 -PS- μ Ps (a und b), plain-PS- μ Ps (c und d) bzw. COOH-PS- μ Ps (e und f); Die Balkenskala betragt 5 μm .

die GU-VEs stark deformiert und zeigten multilamellare Strukturen, was bei reinen GU-VEs, bzw. anderen GU-VE- μ P-Mischungen nicht zu beobachten war (vergleiche Abbildungen 5.32 und 5.34). Die dreimal zentrifugierten Partikel waren schwach positiv (PolyDACMAC-PS- μ Ps(3c)), bzw. negativ geladen (CTAB-PS- μ Ps-(3c)) und zeigten keinerlei Interaktion mit den GU-VEs (siehe Abbildung 5.35 b) und d)).

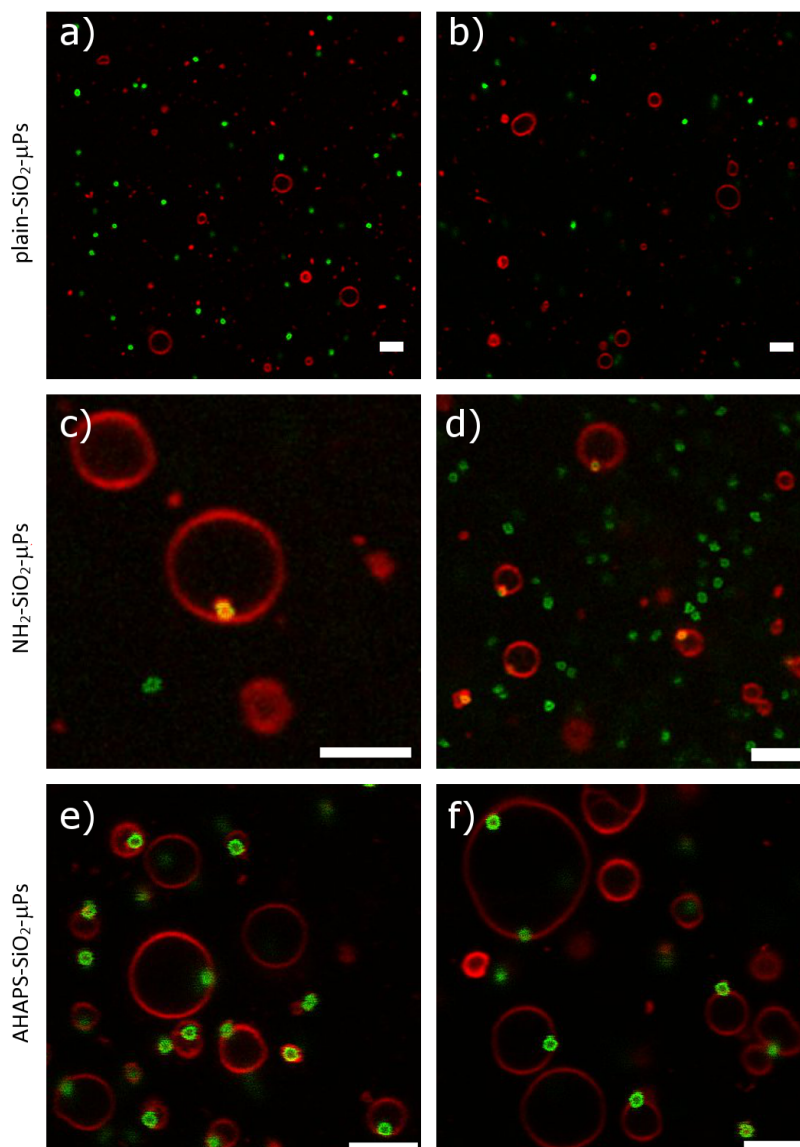


Abbildung 5.34: CLSM-Aufnahmen von Mischungen aus GUVs und verschiedenen SiO_2 - μPs : plain- SiO_2 - μPs (a und b), NH_2 - SiO_2 - μPs (c und d) bzw. AHAPS- SiO_2 - μPs (e und f); Die Balkenskala beträgt $5 \mu\text{m}$.

Für das Verhalten der umgeladenen, einmal zentrifugierten Partikel gibt es zwei mögliche Erklärungen. Wie an den ζ -Potential-Messungen zu sehen ist, nimmt die Ladung beider umgeladener Mikropartikel (CTAB-, bzw. PolyDACMAC-PS- μPs) vom einmaligen zum dreimaligen Zentrifugieren stark ab. Daraus kann gefolgert werden, dass die Moleküle (CTAB bzw. PolyDACMAC) nur schwach auf der Oberfläche adsorbiert sind. Adsorbiert nun ein PolyDACMAC-PS- μPs -(1c) (gleiches gilt für CTAB-PS-

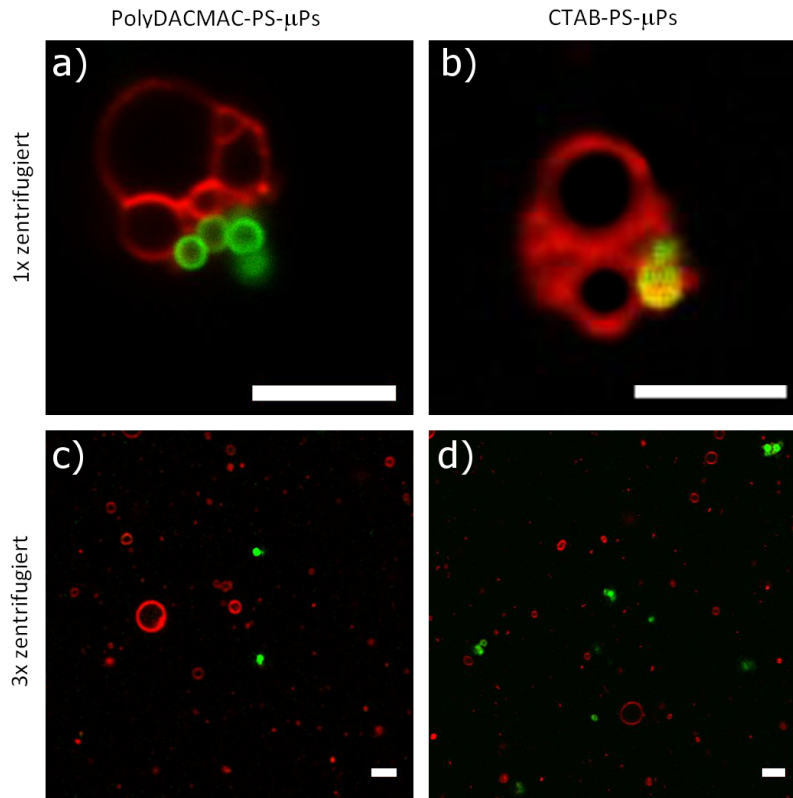


Abbildung 5.35: CLSM-Aufnahme von Mischungen aus GUVs mit umgeladenen PS- μ Ps: a) PolyDACMAC-PS- μ Ps-(1c); b) CTAB-PS- μ Ps-(1c); c) PolyDACMAC-PS- μ Ps-(3c) und d) CTAB-PS- μ Ps-(3c); Die Balkenskala beträgt 5 μ m.

μ Ps-(1c)) an der GUV-Membran, ist es möglich, dass PolyDACMAC-Moleküle in die GUV-Membran eindringen (ähnlich zu einem *Kiss and Run*-Mechanismus [162]). Da die Membran aber negativ und das PolyDACMAC positiv geladen ist, kommt es zu einer Deformierung der ursprünglichen Membran und es treten multilamellare Strukturen auf. Eine andere Erklärung für die multilamellaren Strukturen, die bei den einfach zentrifugierten, umgeladenen Mikropartikeln beobachtet wurden, ist, dass aufgrund des nur einmaligen Zentrifugierens noch viel freies PolyDACMAC bzw. CTAB in der Lösung vorhanden war, da dieses beim Umladen im Überschuss zugegeben wird (vergleiche Abschnitt 4.2.4). Die positiven freien Moleküle könnten mit der negativen GUV-Membran interagieren und die beobachteten Strukturen hervorrufen. Bei den dreimal zentrifugierten, umgeladenen Partikeln ist anzunehmen, dass fast al-

le adsorbierten Moleküle abgewaschen wurden, wodurch ein Mikropartikel vorliegt, das vergleichbar mit dem Ausgangspartikel ($\text{NH}_2\text{-PS-}\mu\text{Ps}$) ist und auch identisches Verhalten in Anwesenheit der GUVs zeigt. Da die umgeladenen Partikel keine neuen Information zu den Wechselwirkungen zwischen Partikeln und GUVs lieferten, wurden sie für die Experimente mit Erythrozyten im folgenden Abschnitt nicht verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mikropartikel, die ohne weitere Modifizierung verwendet wurden mit den GUVs das erwartete Verhalten zeigten: Negativ geladene Mikropartikel (COOH- , $\text{NH}_2\text{-}$ bzw. $\text{plain-PS-}\mu\text{Ps}$ und $\text{plain-SiO}_2\text{-}\mu\text{Ps}$) koexistierten neben den negativen GUVs und positiv geladene Mikropartikel ($\text{NH}_2\text{-}$, bzw. $\text{AHAPS-SiO}_2\text{-}\mu\text{Ps}$) waren zusammen mit den negativen GUVs zu detektieren. Es wurden analoge Aufnahmeexperimente wie im Minimal-Modellsystem durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erhalten. Die Erkenntnisse des Minimal-Modellsystems der Polymersome konnten auf das Modellsystem der GUVs übertragen werden.

5.4 Vom Modellsystem zur Natur

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt die Ergebnisse des Minimal-Modellsystems der Polymersome erfolgreich auf das Modellsystem der GUVs übertragen wurde, wird in diesem Abschnitt der Bogen zum natürlichen System der Erythrozyten gespannt, indem die Ergebnisse der Experimente mit Erythrozyten und verschiedenen modifizierten, $1\ \mu\text{m}$ großen Partikeln präsentiert werden.

5.4.1 Charakterisierung der Erythrozyten und der verwendeten Partikel

Um zu gewährleisten, dass die Erythrozyten überleben können, wurden alle Versuche im Zellmedium RPMI durchgeführt. Es wurden die gleichen Partikel wie in den GUV-Versuchen (Abschnitt 5.3.2) verwendet. Auch hier wurden die ζ -Potentiale der Mikropartikel und RBCs bestimmt (siehe Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8: ζ -Potentiale der verwendeten Mikropartikel und RBCs in RPMI.

Probe	ζ -Potential / mV
NH ₂ -PS- μ Ps	-9
plain-PS- μ Ps	-8
COOH-PS- μ Ps	-13
AHAPS-SiO ₂ - μ Ps	33
NH ₂ -SiO ₂ - μ Ps	-8
plain-SiO ₂ - μ Ps	-28
RBCs	-15

Verglichen mit den ζ -Potentialen der Mikropartikel (Tabelle 5.6) in Wasser, ist anzumerken, dass die NH₂SiO₂- μ Ps nun ein leicht negatives ζ -Potential aufwiesen. Alle anderen Partikel zeigten die gleiche Ladung, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt. Der Grund hierfür könnte sein, dass sich in RPMI vorliegende Ionen, Proteine und Vitamine auf den Partikeln ablagerten.

Um die Erythrozyten in der CLSM detektieren zu können, wurden diese mit *Cell-Mask™ Deep Red* fluoreszenzmarkiert.

5.4.2 Interaktion verschiedener Mikropartikeln mit Erythrozyten

Die in Tabelle 5.8 aufgeführten Mikropartikel wurden mit den RBCs gemischt und im CLSM analysiert.

Wie schon bei den GUVs beobachtet und wie zu erwarten war, zeigten alle negativ geladenen PS- μ Ps (NH₂- und COOH-modifiziert sowie plain) mit den negativen Erythrozyten (-15 mV [163]) keine Wechselwirkungen und waren nebeneinander zu detektieren (vergleiche Abbildung 5.36).

Unerwarteterweise zeigten alle SiO₂- μ Ps, unabhängig von ihrer Ladung, attraktive Interaktion mit den RBCs. Die Partikel deformierten die Membran und wurden teils komplett von der Membran umwickelt. Es konnte jedoch nicht beobachtet werden, dass sich ein komplett eingehüllter Partikel von der Zellmembran abkapselt und im Inneren des Erythrozyten frei diffundiert (siehe Abbildung 5.37).

Mit der CLSM konnte gezeigt werden, dass die plain-SiO₂- μ Ps die Membran deutlich verformten. Wegen der limitierten Auflösung der CLSM, konnte keine Aussage über den genauen Verlauf der Membran in der Nähe der Partikel getroffen werden. Um Informationen darüber zu erhalten, wurde eine Mischung aus plain-SiO₂- μ Ps und RBCs mittels Hochdruckgefrieren (*high pressure freezing*, HPF) temporär fixiert und durch Lösungsmittelwechsel permanent in einen Epoxy-Film eingebettet. Dieser wurde in dünne Scheiben geschnitten, welche mit TEM analysiert wurden (siehe Abbildung 5.38, HPF-Probenpräparation von Christoph Siebert, MPI für Polymerforschung).

In diesen Cryo-Schnitten (Abbildung 5.38) ist eindeutig zu sehen, dass die Partikel nicht komplett von der Zellmembran umschlossen wurden. Damit ein Partikel

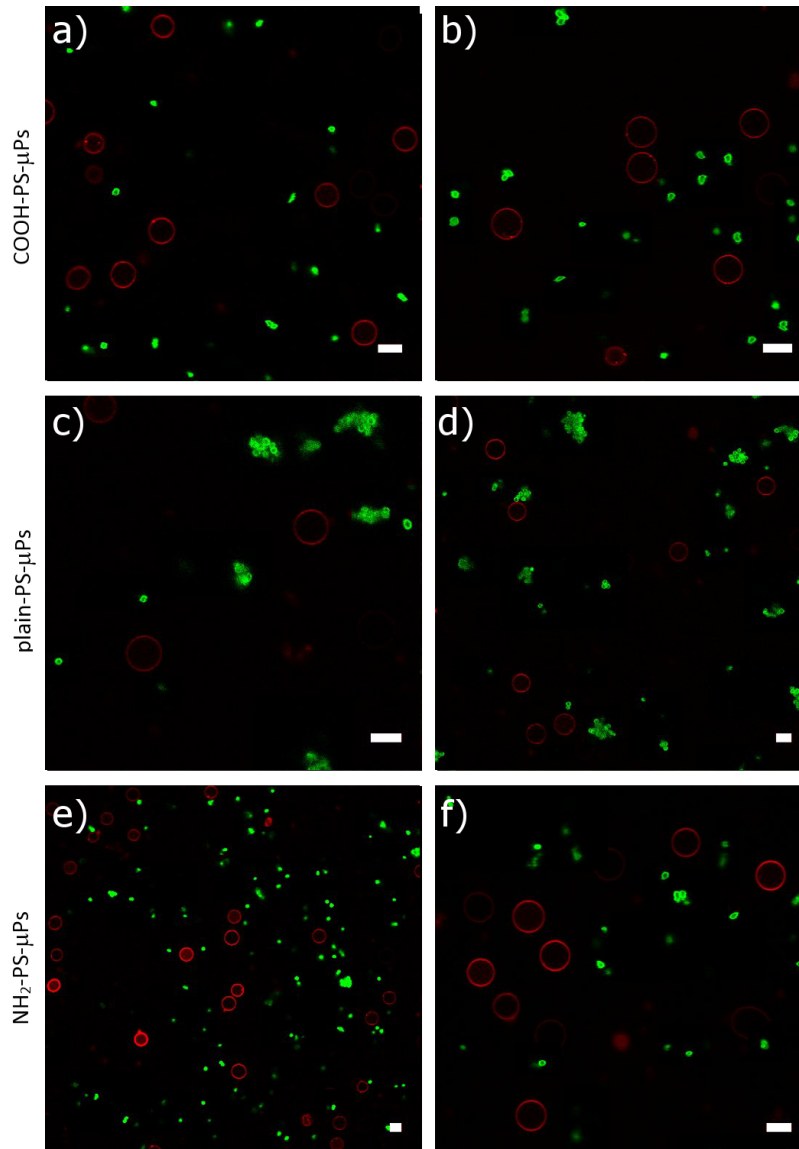


Abbildung 5.36: CLSM-Aufnahmen von Mischungen aus RBCs und verschiedenen PS- μ Ps: NH₂-PS- μ Ps (a und b), plain-PS- μ Ps (c und d) bzw. COOH-PS- μ Ps (e und f); Die Balkenskala beträgt 5 μ m.

vollständig von der Membran umschlossen werden kann, müsste das Zytoskelett der RBCs aufgebrochen werden [22]. Dies findet offensichtlich nicht statt, da die hierfür nötige Energie oder die obligaten Enzyme nicht vorhanden sind.

Es stellte sich die Frage, ob das Verhalten der SiO₂- μ Ps auf das Medium RPMI zurückzuführen war, z.B. in Form einer Ablagerung von in RPMI vorhandenen Mole-

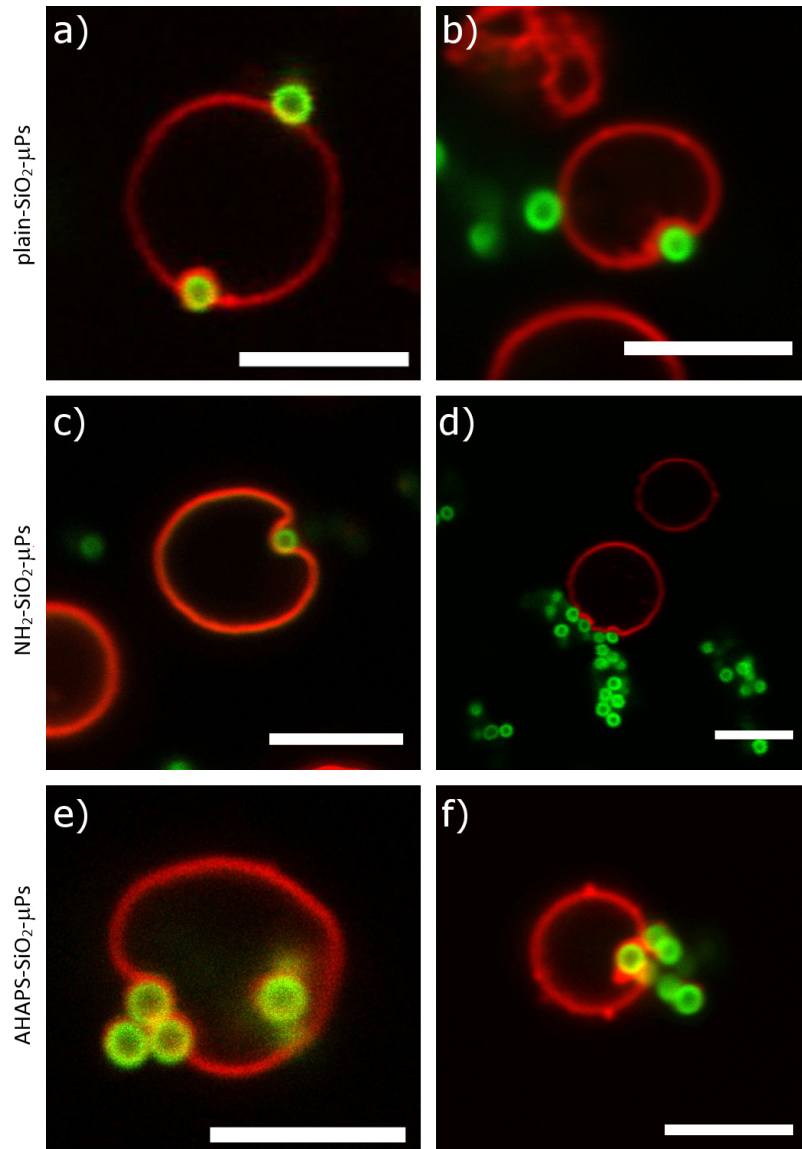


Abbildung 5.37: CLSM-Aufnahmen von Mischungen aus RBCs und verschiedenen SiO_2 - μPs : plain- SiO_2 - μPs (a und b), NH_2 - SiO_2 - μPs (c und d) bzw. AHAPS- SiO_2 - μPs (e und f); Die Balkenskala beträgt $5 \mu\text{m}$.

külen oder Proteinen auf die Mikropartikel. Um Informationen darüber zu erhalten, wurden die Aufnahmeexperimente exemplarisch mit plain- SiO_2 - μPs in verschiedenen Medien durchgeführt. Dabei wurde von der Zusammensetzung des RPMI ausgegangen und versucht, Medien herzustellen, denen ein oder mehrere Komponenten des RPMI fehlen. In reinem Wasser würden die RBCs aufgrund von Osmose zerstört werden, da die Ionenkonzentration im Inneren der RBCs deutlich höher ist als in

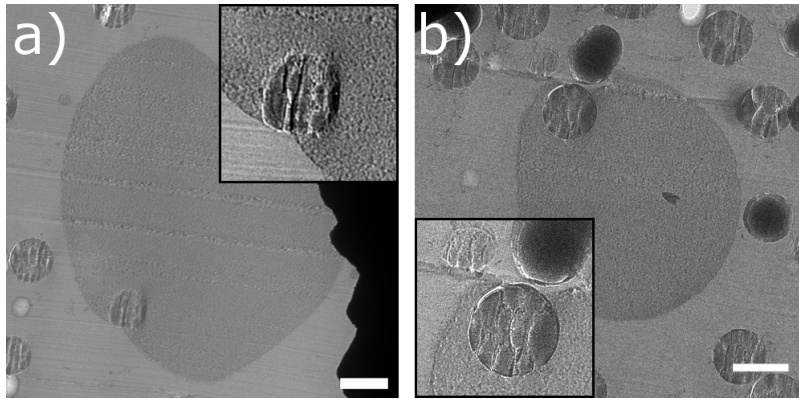


Abbildung 5.38: TEM-Aufnahmen von Cryo-Schnitten: in Epoxidharz eingebettete RB-Cs, die $1\ \mu\text{m}$ plain- SiO_2 - μPs ummantelt haben. Die Balkenskala beträgt $1\ \mu\text{m}$, respektive $100\ \text{nm}$ in der Einfügung.

reinem Wasser. Als minimales Medium wurde PBS gewählt, da dieses isotonisch Zellinneren ist. Um die in RPMI vorliegenden Ionen zu simulieren wurde das mit Ca^{2+} und Mg^{2+} angereicherte PBS^{++} verwendet. Ein weiteres Medium war mit Dextrose versetztes PBS ($\text{PBS}+\text{Dextrsoe}$). Die entsprechenden ζ -Potentiale sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Tabelle 5.9: ζ -Potentiale der plain- SiO_2 - μPs in verschiedenen Medien.

Medium	ζ -Potential / mV
RPMI	-28
PBS	-17
PBS^{++}	-16
$\text{PBS}+\text{Glucose}$	-19

In allen Medien waren die μPs weiterhin negativ geladen. Zellaufnahmeversuche zeigten in allen Medien ein vergleichbares Verformen der Membran durch die Mikropartikel wie in den RPMI-Versuchen (siehe Abbildung 5.39).

Aus diesen Experimenten ist zu folgern, dass das Medium, in dem die Aufnahmeex-

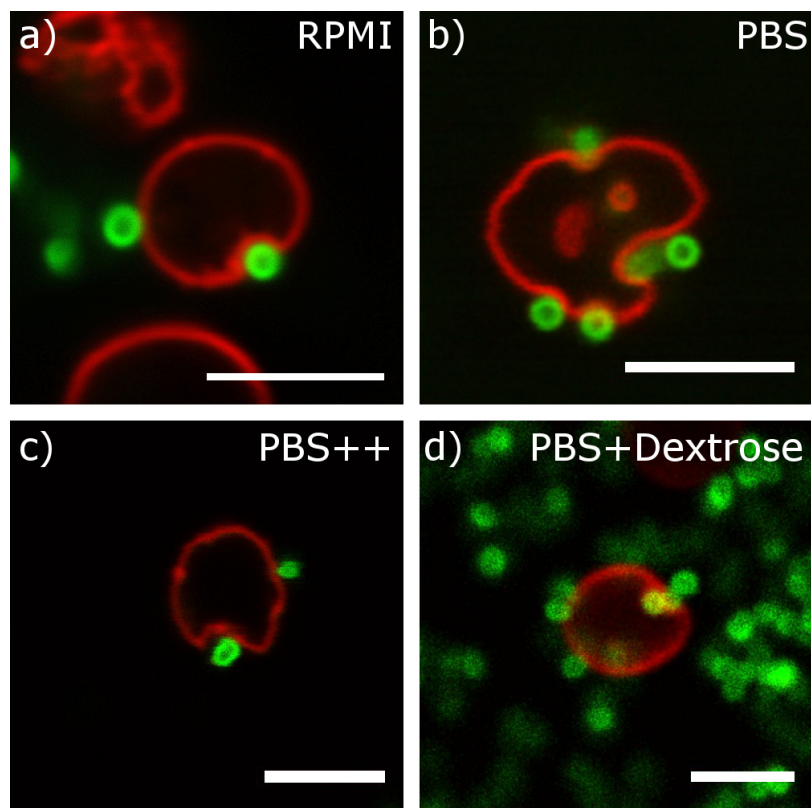


Abbildung 5.39: CLSM-Aufnahme von RBCs, die mit plain-SiO₂- μ Ps gemischt wurden in a) RPMI b) PBS c) PBS++ und d) PBS+Dextrose. Die Balkenskala beträgt 5 μ m.

perimente durchgeführt wurden keinen Einfluss auf das unerwartete Verhalten der plain-SiO₂- μ Ps hat. Es stellte sich die Frage, wie das sehr interessante Verhalten der SiO₂- μ Ps zu erklären ist. Eine Erklärung wäre, dass auf den Erythrozyten lokale positive Regionen vorliegen, an welche sich die negativen SiO₂- μ Ps binden und das beobachtete Umhüllen hervorrufen. Diese Erklärung steht aber im Widerspruch zu den Beobachtungen bei den PS- μ Ps, da hier negativ geladene Partikel keinerlei Attraktion zeigen. Es ist jedoch bekannt, dass sich SiO₂-Partikel, deren Oberflächenladung vergleichbar ist, mit entsprechenden PS-Partikeln, anders verhalten. So zeigen die beiden Materialien unterschiedliches Verhalten bei der Adsorption von Proteinen im Serum [164]. Hier wird argumentiert, dass bei Polysytrol aufgrund des vorhandenen Polymers zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen vorliegen. Der genaue Einfluss von SiO₂-Partikeln ist jedoch noch nicht verstanden und bedarf weiterer Experimen-

te.

Unabhängig von dem interessanten Verhalten der SiO_2 - μPs , zeigten die $\text{PS-}\mu\text{Ps}$ das erwartete Verhalten, welches vergleichbar mit den Ergebnissen aus den GUV- Experimenten ist. Es kann also gesagt werden, dass Ergebnisse vom Minimal-Modellsystem der Polymersome erfolgreich über das Modellsystem der GUVs auf ein natürliches System übertragen wurden.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert durch mikroskopische Analysen ein Verständnis der Interaktionen zwischen (Nano-)Partikeln und Polymersomen, riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) bzw. Erythrozyten (rote Blutkörperchen, *red blood cells*, RBCs).

Polymersome

Das von Jaskiewicz et al. eingeführte Minimal-Modellsystem der Polymersome [118] basierte auf dem Polydimethylsiloxan-Methyloxazolin-Blockcopolymer (BC, PDMS-*b*-PMOXA), welches erstmals von Egli et al. hergestellt wurde [145]. Aufgrund schwieriger Reproduzierbarkeit wurde die Synthese des BC neu erarbeitet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die reproduzierbare, kontrollierte Synthese des BCs möglich ist. Dabei wurde der PDMS-Block konstant gehalten und nur der PMOXA-Block in der Länge variiert. So entstanden BCs mit variablen PMOXA-Blöcken (PDMS₆₅-*b*-PMOXA_{*i*} mit $4 < i < 28$). Es wurde festgestellt, dass nur aus BCs mit 11-21 MOXA-Wiederholungseinheiten Polymersome hergestellt werden konnten.

Die hergestellten Polymersome zeigten in der Cryo-Transmissionselektronenmikros-

kopie (Cryo-TEM) keine Abhängigkeit zwischen Länge des PMOXA-Blocks und Membrandicke. Kleinwinkelröntgenstreuung lieferte keine neuen Ergebnisse, da hier nur der hydrophobe Teil der Membran detektiert werden konnte, da der hydrophile Teil in Wasser gequollen war und somit keinen Kontrast lieferte.

Die physikalischen Eigenschaften der Polymersome wurden aus quantitativen bildgebenden AFM-Messungen gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass der Elastizitätsmodul und der Biegemodul der Polymersome von der Anzahl an MOXA-Wiederholungseinheiten abhängt und somit die Eigenschaften der Membran beeinflussbar sind.

Wie Karmena Jaskiewicz in ihrer Dissertation vorschlug, wurden Experimente mit Gold-Nanopartikeln durchgeführt. Diese sind modifizierbar, so dass positiv sowie leicht und stark negativ geladene Partikel hergestellt werden konnten. Kraft-Abstands-Kurven von auf Glimmer gespreiteten Polymersomen und modifizierten Cantilevern (= *Colloidal Probe*-Technik) zeigten, dass sich die positiv geladenen Polymersome und die positiv geladenen Cantilever voneinander abstießen. Leicht negativ geladene Cantilever zeigten leichte Attraktion, stark negativ geladene starke Attraktion. Es war zu folgern, dass die Wechselwirkungen zwischen modifizierten Cantilevern und Polymersomen schwache elektrostatische Wechselwirkungen waren. Daraus resultierten beim Mischen von Polymersomen mit entsprechenden Gold-Nanopartikeln drei Szenarien: Koexistieren von positiv geladenen CTAB-Au-NPs, Anlagerung und Verformen der Membran durch die leicht negativen PEG-Au-NPs und Aufnahme der stark negativ geladenen Citrat-Au-NPs. Dieses Ergebnis konnte mit Cryo-TEM nachgewiesen werden.

Aus den Cryo-TEM-Abbildungen der aufgenommenen Citrat-Au-NPs und Simulationen von Mingyang Hu konnten Informationen über den molekularen Aufbau der Membran und den Aufnahmeprozess gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass bei der Aufnahme von Nanopartikeln Defekte in der Membran entstehen, die von den

Molekülen, welche die Membran aufbauen, kompensiert werden müssen. Die dafür nötige Energie wird aus den attraktiven Wechselwirkungen der Nanopartikel mit den Polymersomen gewonnen.

Des Weiteren wurden Gold-Nanostäbchen (Au-NRs) so modifiziert, dass sie negativ geladen waren. Es konnte gezeigt werden, dass Au-NRs in Polymersome aufgenommen werden, wobei keine Abhängigkeit von der Form zu beobachten war. Es konnten Anzeichen für die beide theoretisch postulierten Aufnahmemechanismen [110, 112] gefunden werden.

Riesige unilamellare Vesikel

Um eine Brücke vom Minimal-Modellsystem der Polymersomen zu dem natürlichen System der Erythrozyten zu schlagen, wurden Experimente mit GUVs und 1 μm großen, verschieden modifizierten Polystyrol- und Siliciumdioxid-Partikeln (PS- μPs bzw. SiO₂- μPs) durchgeführt und mit Konfokalmikroskopie analysiert. Um die beiden Modellsysteme vergleichen zu können, wurde das Radienverhältnis von Partikel zu Vesikel mit 1:6 konstant gehalten. Dabei waren alle PS- μPs negativ geladen. Bei den SiO₂- μPs lagen positiv und negativ geladene Mikropartikel vor. Die negativ geladenen GUVs (aus Lecithin hergestellt), zeigten das gleiche Verhalten wie die Polymersome. Alle negativ geladenen Mikropartikel zeigten keinerlei Interaktion mit den GUVs, positiv geladene Mikropartikel waren zusammen mit den GUVs zu beobachten. Auch in diesem System war die treibende Kraft elektrostatischer Natur. Es konnten also Ergebnisse des Minimal-Modellsystems der Polymersome auf das Modellsystem der GUVs übertragen werden.

Erythrozyten

Die Ergebnisse des Modellsystems der GUVs wurde in einem letzten Schritt auf

natürliche Zellen, die Erythrozyten, übertragen. Erythrozyten wurden gewählt, da diese, wie die vorhergehenden Modellsysteme, keine Enzyme oder Proteine besitzen die eine endozytotische Aufnahme vermitteln. In diesen Versuchen wurden die gleichen Partikel wie in den GUV-Experimenten verwendet. Wie zu erwarten, zeigten die negativ geladenen Polystyrol-Mikropartikel keine Interaktion mit den RBCs. Überraschenderweise verformten alle SiO_2 - μPs , unabhängig von Ladung und Medium die Membran stark und wurden von dieser fast komplett unwickelt, was mittels CLSM und TEM gezeigt werden konnte. Es ist in der Literatur bekannt, dass sich SiO_2 -Partikel anders verhalten als z.B. entsprechende Polystyrol-Partikel. Unabhängig von dem interessanten Verhalten der SiO_2 - μPs , zeigten die PS- μPs ein Verhalten, welches vergleichbar mit den Ergebnissen aus den GUV-Experimenten war. Es kann also gesagt werden, dass Ergebnisse vom Minimal-Modellsystem der Polymersome erfolgreich über das Modellsystem der GUVs auf ein natürliches System übertragen werden konnte.

Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte das Minimal-Modellsystem der Polymersome weiterentwickelt und besser verstanden werden. Die Erkenntnis dieser Arbeit über die physikalischen Eigenschaften und den molekularen Aufbau der polymeren Membran können bei der Entwicklung anderer Modellsysteme genutzt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Kombination aus mikroskopischen Analysen und Computersimulationen zu sehr interessanten Ergebnissen führen kann. Die entwickelte *Colloidal Probe*-Methode wird Anwendung finden, wenn in Systemen gleichzeitig nach physikalischen Eigenschaften und Wechselwirkungen gefragt wird.

In dieser Arbeit wurden erfolgreich Ergebnisse vom Modellsystem der Polymersome schrittweise auf das System der Erythrozyten übertragen. Diese Arbeit zeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, eine Brücke vom Modellsystem zu natürlichen Systemen zu schlagen. So können an einfachen Modellsystemen Erkenntnisse über Prozesse gewonnen werden, die zum Verständnis der selben Prozess in weitaus komplizierteren Systemen dienen.

Tabelle 6.1: Darstellung der Messgrößen Polymersombreite W , Höhe H und Steifheit k_{mem} und die daraus berechneten Größen Youngs Modulus E und Biegesteifheit κ_b der BC Vesikel mit 11 PMOXA Wiederholungseinheiten

W / nm	H / nm	k_{mem} /	E / MPa	κ_B / 10^{-19} joule
380	62	0,038	26,75	66,82
523	52	0,024	35,98	89,88
480	158	0,035	19,97	49,87
430	140	0,021	10,87	27,15
526	165	0,020	12,83	32,06
391	65	0,033	23,18	57,90
537	101	0,015	13,25	33,09
408	56	0,034	29,96	74,83
476	48	0,020	27,11	67,71
540	162	0,0120	13,08	32,67
373	89	0,025	12,97	32,40
329	49	0,030	19,16	47,87
363	44	0,031	26,74	66,80
495	46	0,018	26,15	65,32
356	44	0,023	18,66	46,62
490	156	0,029	16,95	42,33
440	81	0,026	19,11	47,72

Tabelle 6.2: Darstellung der Messgrößen Polymersombreite W , Höhe H und Steifheit k_{mem} und die daraus berechneten Größen Youngs Modulus E und Biegesteifheit κ_b der BC Vesikel mit 15 PMOXA Wiederholungseinheiten

W / nm	H / nm	k_{mem} /	E / MPa	κ_B / 10^{-19} joule
444	78	0.041	20.17	98.85
473	78	0.039	21.77	106.70
345	74	0.055	18.16	89.00
350	74	0.062	21.20	103.90
478	82	0.051	27.59	135.23
474	79	0.053	29.42	144.19
412	82	0.063	26.18	128.33
375	67	0.069	28.45	139.45
476	77	0.044	24.71	121.11
395	42	0.052	35.11	172.06
412	108	0.065	22.67	111.11
469	128	0.058	22.45	110.01
424	116	0.063	21.94	107.52
352	66	0.068	25.21	123.57
423	65	0.058	30.34	148.70
316	60	0.064	21.14	103.60
254	41	0.095	28.84	141.33

Tabelle 6.3: Darstellung der Messgrößen Polymersombreite W , Höhe H und Steifheit k_{mem} und die daraus berechneten Größen Youngs Modulus E und Biegesteifheit κ_b der BC Vesikel mit 17 PMOXA Wiederholungseinheiten

W / nm	H / nm	k_{mem} /	E / MPa	κ_B / 10^{-19} joule
309	69	0.149	44.17	208.67
264	85	0.143	29.63	139.96
298	76	0.145	38.14	180.15
315	73	0.144	42.47	200.63
288	83	0.155	36.86	174.11
304	67	0.154	45.31	214.05
275	79	0.155	35.25	166.52
371	79	0.165	60.66	286.55
349	79	0.134	44.46	210.05
278	66	0.155	39.73	187.67
258	71	0.147	32.07	151.51
231	68	0.145	27.37	129.28
233	75	0.138	25.24	119.21
292	97	0.139	31.46	148.60
245	70	0.155	31.49	148.76
270	70	0.134	31.63	149.40
266	78	0.144	31.36	148.12
301	71	0.141	39.29	185.60
222	69	0.155	27.42	129.51
249	67	0.154	32.83	155.07
273	81	0.155	34.44	162.71
254	74	0.144	30.04	141.89
265	76	0.134	29.39	138.84
241	85	0.153	27.96	132.10
303	78	0.144	38.30	180.92
286	80	0.114	27.33	129.13
321	79	0.152	43.99	207.81
272	81	0.144	31.83	150.34
293	90	0.165	38.72	182.92

Tabelle 6.4: Darstellung der Messgrößen Polymersombreite W , Höhe H und Steifheit k_{mem} und die daraus berechneten Größen Youngs Modulus E und Biegesteifheit κ_b der BC Vesikel mit 19 PMOXA Wiederholungseinheiten

W / nm	H / nm	k_{mem} /	E / MPa	κ_B / 10^{-19} joule
393	55	0,073	60,86	148,56
402	76	0,047	31,45	76,78
420	99	0,060	36,49	89,06
451	60	0,041	41,80	102,03
546	72	0,034	41,95	102,41
358	55	0,046	32,25	78,74
387	69	0,020	13,47	32,88
494	84	0,028	24,89	60,76
462	79	0,022	17,95	43,83
396	66	0,015	11,24	27,43
389	54	0,028	23,20	56,64
413	98	0,020	12,08	29,49
401	95	0,020	11,74	28,67
308	55	0,022	11,88	29,00

Lebenslauf

Name: Max Bernhardt

Geburtsdatum: 07. September 1984

Geburtsort: Neustadt/Aisch

Bildungsweg

10/2011 - 12/2014 Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz
Physikalische Chemie der Polymere
Promotion

10/2009 - 09/2011 Universität Regensburg
Physikalische Chemie (Condensed and Soft Matter)
Master of Science

01/2011 - 07/2011 CEA Saclay, Paris, Frankreich
Physikalische Chemie (Condensed and Soft Matter)
Forschungsaufenthalt zur Masterarbeit

Anhang

10/2006 - 09/2009 Universität Regensburg
Allgemeine Chemie
Bachelor of Science

10/2004 - 09/2006 Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg
Physik

09/1995 - 08/2004 Wolfgang-Borchert-Gymnasium, Langenzenn
Abitur

Veröffentlichungen

Artikel **M. Bernhardt** and A. Koch et al.; Interactions of Gold-Nanoparticles with Polymeric Vesicles - in Bearbeitung

A. H. R. Koch, G. L  v  que, S. Harms, K. Jaskiewicz, **M. Bernhardt**, A. Henkel, C. S  nnichsen, K. Landfester, and G. Fytas; Nanoletters; 2014, 14(7), 4138-4144b

A. J. Svagan, A. Musyanovych, M. Kappl, **M. Bernhardt**, G. Glasser, Ch. Wohnhaas, L. A. Berglund, J. Risbo, and K. Landfester; Biomacromolecules; 2014; 15(5), 1852-1859

S. Winzen, **M. Bernhardt**, D. Schaeffel, A. Koch, M. Kappl, K. Koynov, K. Landfester and A. Kroeger; Soft Matter; 2013, 9, 5883-5890

M. Bauer, **M. Bernhardt**, T. Charitat, P. K  kicheff, Ch. Fajolles, G. Fragneto, C. M. Marques and J. Daillant; Soft Matter; 2013, 9, 1700-1710

Poster The Physics behind the uptake of Nanoparticles into Polymeric Vesicles; ISMC 2013, Rom

The Physics behind the uptake of Nanoparticles into Polymeric Vesicles; Wissenschaftsforum 2013, Darmstadt

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> = Rasterkraftmikroskopie
AR	<i>Aspect Ratio</i> = Seitenverhältnis
BC	Block-Copolymer
cDICE	<i>continous Droplet Interface Crossing Encapsulation</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Mikroskop</i> = Konfokalmikroskop
CNC	Nanokristalle
Cryo-TEM	Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAS	<i>dispersing aqueous solution</i>
DCM	Dichlormethan, Methylenchlorid
DMF	Dimethylformamid
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPD	Dissipative Partikel Dynamik
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
EAS	<i>encapsulating aqueous solution</i>
Egg PC	L- α -Phosphatidylcholine aus Eiweiß

Abkürzung	Bedeutung
EtOH	Ethanol
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FD-Messungen	Kraft-Abstands-Messung
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
GUV	Riesiges unilamellares Vesikel
HAP-NPs	Hydroxyapatit Nanopartikel
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
HPF	High-Pressure Freezing, Hochdruckgefrieren
HR-TEM	hochauflösende TEM
LCST	kritischen Lösungstemperatur
LDS	Lipiddoppelschicht
LOS	<i>Lipid in Oil Solution</i>
LUV	Großes unilamellares Vesikel
MeOH	Methanol
MOXA	2-Methyl-2-oxazoline
MUA	11-Mercaptoundecansäure
NaOH	Natronlauge
NFC	Cellulose-Nanofasern
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPs	Nanopartikel
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS++	Mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ versetztes PBS
PCS	Photokorrelationsspektroskopie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDMS-b-	Polydimethylsiloxan-bloc-Polymethyloxazolin
PMOXA	
PDMS-H	Silan terminiertes Polydimethylsiloxan

Abkürzung	Bedeutung
PDMS-OH	Hydroxy terminiertes Polydimethylsiloxan
PEG5000	Poly(ethylenglycol) 2-mercaptoethyl Ether Essigsäure
PMOXA	Polymethyloxazolin
PolyDACMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
QI	Quantitative Imaging
RBC	Rote Blutkörperchen
SAXS	Small angle X-Ray Scattering
SDS	Natriumlaurylsulfat
SUV	Kleines unilamellares Vesikel
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TfSA	Trifluoromethanesulfon Anhydride
THF	Tetrahydrofuran
A	Oberfläche einer Lipidkopfgruppe
B	Breites eines Nanostäbchens
D	Durchmesser von (Nano-)Partikeln
d_{min}	Auflösungsvermögen eines Mikroskops
E	Young's Modulus
H	Membrandicke eines Polymersoms
H	Höhe eines gespreiteten Polymersoms
K_A	Druckfestigkeit
k_{mem}	Steifheit des Polymersoms
l	Länge eines Lipides
L	Länge eines Nanostäbchens
P	Packungsparameter
R	Krümmungsradius eines gespreiteten Polymersoms
R_0	Radius eines Polymersoms

Anhang

Abkürzung	Bedeutung
W	Breite eines gespreiteten Polymersoms
κ_B	Biegesteifheit
κ_G	Gaußsche Biegesteifheit
λ	Wellenlänge
ν	Poisson-Verhältnis

Literaturverzeichnis

- [1] R. LANGER and N. PEPPAS, *Biomaterials* **2**, 201 (1981).
- [2] J. FOLKMAN and D. M. LONG, *Journal of Surgical Research* **4**, 139 (1964).
- [3] R. L. L. FOLKMAN, *Nature* **263**, 797 (1976).
- [4] A. RÖSLER, G. W. VANDERMEULEN, and H.-A. KLOK, *Advanced Drug Delivery Reviews* **64, Supplement**, 270 (2012).
- [5] A. GARETH and P. HUGHES, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **1**, 22 (2005).
- [6] H. GAO, W. SHI, and L. B. FREUND, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9469 (2005).
- [7] Y.-L. WU, N. PUTCHA, K. W. NG, D. T. LEONG, C. T. LIM, S. C. J. LOO, and X. CHEN, *Accounts of Chemical Research* **46**, 782 (2013).
- [8] B. ALBERTS, J. BRAY, D. AND LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, and J. D. WATSON, *Molecular biology of the cell*, volume 4. ed., Francis & Taylor, New York, NY, 2002.
- [9] H. T. MCMAHON and E. BOUCROT, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 517 (2011).

- [10] D. M. UNDERHILL and A. OZINSKY, *Annual Review of Immunology* **20**, 825 (2002).
- [11] B. FADEEL and A. E. GARCIA-BENNETT, *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 362 (2010), Targeted Delivery Using Inorganic Nanosystem.
- [12] W. JAHNEN-DECHENT and U. SIMON, *Nanomedicine* **3**, 601 (2008).
- [13] G. BARDI, M. A. MALVINDI, L. GHERARDINI, M. COSTA, P. P. POMPA, R. CINGOLANI, and T. PIZZORUSSO, *Biomaterials* **31**, 6555 (2010).
- [14] A. ALBANESE, P. S. TANG, and W. C. CHAN, *Annual Review of Biomedical Engineering* **14**, 1 (2012), PMID: 22524388.
- [15] C. LIU, X. ZHEN, X. WANG, W. WU, and X. JIANG, *Soft Matter* -, (2011).
- [16] J. J. LU, R. LANGER, and J. CHEN, *Molecular Pharmaceutics* **6**, 763 (2009), PMID: 19292453.
- [17] W. EVANS, D.F.;WENNERSTROM, *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, Wiley, 1999.
- [18] J. ZHAO, D. VOLLHARDT, G. BREZESINSKI, S. SIEGEL, J. WU, J. LI, and R. MILLER, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **171**, 175 (2000).
- [19] V. YAMINSKY, T. NYLANDER, and B. NINHAM, *Langmuir* **13**, 1746 (1997).
- [20] H.-J. BUTT, B. CAPPELLA, and M. KAPPL, *Surface Science Reports* **59**, 1 (2005).
- [21] D. H. MURRAY, L. K. TAMM, and V. KIESSLING, *Journal of Structural Biology* **168**, 183 (2009), Supported Membranes.
- [22] E. SACKMANN, *Chapter 1 Biological Membranes Architecture and Function. In R. Lipowsky and E. Sackmann, Structure and Dynamics of Membranes*, North-Holland, 1995.

- [23] M. MONTAL and P. MUELLER, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**, 3561 (1972).
- [24] P. MUELLER, D. O. RUDIN, H. T. TIEN, and W. C. WESCOTT, *Nature* **194**, 979 (1962).
- [25] S. F. FENZ and K. SENGUPTA, *Integr. Biol.* **4**, 982 (2012).
- [26] M. I. ANGELOVA and D. S. DIMITROV, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303 (1986).
- [27] D. E. DISCHER and A. EISENBERG, *Science* **297**, 967 (2002).
- [28] M. ANTONIETTI and S. FÖRSTER, *Advanced Materials* **15**, 1323 (2003).
- [29] R. P. BRINKHUIS, F. P. J. T. RUTJES, and J. C. M. VAN HEST, *Polym. Chem.* **2**, 1449 (2011).
- [30] P. LIM SOO and A. EISENBERG, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **42**, 923 (2004).
- [31] K. KITA-TOKARCZYK, J. GRUMELARD, T. HAEFELE, and W. MEIER, *Polymer* **46**, 3540 (2005).
- [32] A. MECKE, C. DITTRICH, and W. MEIER, *Soft Matter* **2**, 751 (2006).
- [33] D. BOAL, *Mechanics of the Cell*, Cambridge University Press, 2001, Cambridge Books Online.
- [34] S. J. SINGER and G. L. NICOLSON, *Science* **175**, 720 (1972).
- [35] SCHMIDT, LANG, and HECKMANN, *Physiologie des Menschen*, volume 31 of *Springer-Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [36] VOET, VOET, and PRATT, *Lehrbuch der Biochemie*, volume 2 of *Lehrbuch*, Wiley-VCH, 2010.
- [37] Y. ZHAO, X. SUN, G. ZHANG, B. G. TREWYN, I. I. SLOWING, and V. S.-Y. LIN, *ACS Nano* **5**, 1366 (2011).

- [38] HEINRICH, MÜLLER, and GRAEVE, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Link, 2014.
- [39] J. ISRAELACHVILI, *Intermolecular and Surface Forces*, volume 3. Edition, Elsevier Inc, 2011.
- [40] J. N. ISRAELACHVILI, D. J. MITCHELL, and B. W. NINHAM, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **72**, 1525 (1976).
- [41] S. T. HYDE, *J. Phys. Colloques* **51**, 209 (1990).
- [42] G. ODIAN, *Principles of Polymerization*, Wiley, 2004.
- [43] Y. MAI and A. EISENBERG, *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5969 (2012).
- [44] H. HASEGAWA, T. HASHIMOTO, and S. T. HYDE, *Polymer* **37**, 3825 (1996).
- [45] F. S. BATES and G. H. FREDRICKSON, *Annual Review of Physical Chemistry* **41**, 525 (1990), PMID: 20462355.
- [46] B. M. DISCHER, Y.-Y. WON, D. S. EGE, J. C.-M. LEE, F. S. BATES, D. E. DISCHER, and D. A. HAMMER, *Science* **284**, 1143 (1999).
- [47] L. ZHANG and A. EISENBERG, *Science* **268**, 1728 (1995).
- [48] M. BAUER, *Membrane Functionalisation using Polyrotaxanes with amphiphilic Cyclodextrins*, PhD thesis, Universität Regensburg, 2011.
- [49] MALAQUIN, L., CHARITAT, T., and DAILLANT, J., *Eur. Phys. J. E* **31**, 285 (2010).
- [50] E. T. CASTELLANA and P. S. CREMER, *Surface Science Reports* **61**, 429 (2006).
- [51] X. HE and F. SCHMID, *Macromolecules* **39**, 2654 (2006).
- [52] T. UNEYAMA, *The Journal of Chemical Physics* **126**, (2007).

- [53] P. WALDE, K. COSENTINO, H. ENGEL, and P. STANO, *ChemBioChem* **11**, 848 (2010).
- [54] A. V. HUGHES, S. J. ROSER, M. GERSTENBERG, A. GOLDAR, B. STIDDER, R. FEIDENHANS'L, and J. BRADSHAW, *Langmuir* **18**, 8161 (2002).
- [55] A. SAMAD, Y. SULTANA, and M. AQIL, *Current Drug Delivery* **4**, 297 (2007).
- [56] I. P. KAUR, A. GARG, A. K. SINGLA, and D. AGGARWAL, *International Journal of Pharmaceutics* **269**, 1 (2004).
- [57] S. GANTA, H. DEVALAPALLY, A. SHAHIWALA, and M. AMIJI, *Journal of Controlled Release* **126**, 187 (2008).
- [58] A. PICKER, H. NUSS, P. GUENOUN, and C. CHEVALLARD, *Langmuir* **27**, 3213 (2011).
- [59] A. FISCHER, A. FRANCO, and T. OBERHOLZER, *ChemBioChem* **3**, 409 (2002).
- [60] A. SALIC, A. TUSEK, and B. ZELIC, *Journal of Applied Biomedicine* **10**, 137 (2012).
- [61] P. WALDE, *BioEssays* **32**, 296 (2010).
- [62] F. MENG and Z. ZHONG, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2**, 1533 (2011).
- [63] J. REEVES and R. DOWBEN, *Journal of Cellular Physiology* **73**, 49 (1969).
- [64] M. ABKARIAN, E. LOISEAU, and G. MASSIERA, *Soft Matter* **7**, 4610 (2011).
- [65] K. AKASHI, H. MIYATA, H. ITOH, and K. KINOSITA, *Biophysical Journal* **71**, 3242 (1996).
- [66] J. R. HOWSE, R. A. L. JONES, G. BATTAGLIA, R. E. DUCKER, G. J. LEGGETT, and A. J. RYAN, *Nat Mater* **8**, 507 (2009).
- [67] F. OLSON, C. HUNT, F. SZOKA, W. VAIL, and D. PAPAHAJDOPOULOS, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **557**, 9 (1979).

- [68] M. XIAO, J. LIU, J. YANG, R. WANG, and D. XIE, *Soft Matter* **9**, 2434 (2013).
- [69] U. SEIFERT, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1**, 350 (1996).
- [70] S. LI and N. MALMSTADT, *Soft Matter* **9**, 4969 (2013).
- [71] F. MENGER and M. ANGELOVA, *Accounts of Chemical Research* **31**, 789 (1998).
- [72] S. SVETINA and B. ZEKS, *ANATOMICAL RECORD* **268**, 215 (2002).
- [73] A. CHAKRABARTI, R. BREAKER, G. JOYCE, and D. DEAMER, *Journal of Molecular Evolution* **39**, 555 (1994).
- [74] K. SHOUDA and T. SUGAWARA, *Soft Matter* **2**, 402 (2006).
- [75] W. YU, K. SATO, M. WAKABAYASHI, T. NAKAISHI, E. KO-MITAMURA, Y. SHIMA, I. URABE, and T. YOMO, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 590 (2001).
- [76] S. NOMURA, K. TSUMOTO, T. HAMADA, K. AKIYOSHI, Y. NAKATANI, and K. YOSHIKAWA, *ChemBioChem* **4**, 1172 (2003).
- [77] P. M. GARDNER, K. WINZER, and B. G. DAVIS, *Nature Chemistry* **1**, 377 (2009).
- [78] K. JASKIEWICZ, *Transport of nanoparticles into polymersomes: a minimal model system of particles passage through biological membranes*, PhD thesis, Max-Planck-Institut für Polymerforschung, 2012.
- [79] R. M. HOCHMUTH, *Journal of Biomechanics* **33**, 15 (2000).
- [80] Q. GUO, S. PARK, and H. MA, *Lab Chip* **12**, 2687 (2012).
- [81] K. JASKIEWICZ, M. MAKOWSKI, M. KAPPL, K. LANDFESTER, and A. KROEGER, *Langmuir* **28**, 12629 (2012).

- [82] E. I. GOKSU, J. M. VANEGAS, C. D. BLANCHETTE, W.-C. LIN, and M. L. LONGO, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 254 (2009), <ce:title>Lipid Interactions, Domain Formation, and Lateral Structure of Membranes</ce:title>.
- [83] E. EVANS, *Biophysical Journal* **14**, 923 (1974).
- [84] A. E. A. S. EVANGELOPOULOS, E. GLYNOS, F. MADANI-GRASSET, and V. KOUTSOS, *Langmuir* **28**, 4754 (2012).
- [85] W. RAWICZ, K. OLBRICH, T. MCINTOSH, D. NEEDHAM, and E. EVANS, *Biophysical Journal* **79**, 328 (2000).
- [86] B. KOENIG, H. STREY, and K. GAWRISCH, *Biophysical Journal* **73**, 1954 (1997).
- [87] A. ZILKER, M. ZIEGLER, and E. SACKMANN, *Phys. Rev. A* **46**, 7998 (1992).
- [88] P. M(É)L(É)ARD, C. GERBEAUD, T. POTT, L. FERNANDEZ-PUENTE, I. BIVAS, M. MITOV, J. DUFOURCQ, and P. BOTHOREL, *Biophysical Journal* **72**, 2616 (1997).
- [89] R. KWOK and E. EVANS, *Biophysical Journal* **35**, 637 (1981).
- [90] D. V. ZHELEV, *Biophysical Journal* **75**, 321 (1998).
- [91] J. FAUCON, M. D. MITOV, P. M(É)L(É)ARD, I. BIVAS, and P. BOTHOREL, *J. Phys. France* **50**, 2389 (1989).
- [92] D. CUVELIER, I. DERÉNYI, P. BASSEREAU, and P. NASSOY, *Biophysical Journal* **88**, 2714 (2005).
- [93] M. SCHNEIDER, J. JENKINS, and W. WEBB, *Biophysical Journal* **45**, 891 (1984).
- [94] E. EVANS and R. WAUGH, *Biophysical Journal* **20**, 307 (1977).

- [95] E. EVANS and R. WAUGH, *Journal of Colloid and Interface Science* **60**, 286 (1977).
- [96] F. BROCHARD and J. LENNON, *J. Phys. France* **36**, 1035 (1975).
- [97] J. EVANS, W. GRATZER, N. MOHANDAS, K. PARKER, and J. SLEEP, *Biophysical Journal* **94**, 4134 (2008).
- [98] S. D. CONNER and S. L. SCHMID, *nature* **422**, 37 (2003).
- [99] Y. HAN, X. WANG, H. DAI, and S. LI, *ACS Applied Materials & Interfaces* **4** (9), 4616 (2012).
- [100] E. CHAMBERS and S. MITRAGOTRI, *Experimental Biology and Medicine* **232**, 958 (2007).
- [101] M. GEISER, B. ROTHEN-RUTISHAUSER, N. KAPP, S. SCHUERCH, W. KREYLING, H. SCHULZ, M. SEMMLER, V. IM HOF, J. HEYDER, and P. GEHR, *Environ Health Perspect* **11**, 1555 (2005).
- [102] T. WANG, J. BAI, X. JIANG, and G. U. NIENHAUS, *ACS Nano* **6**, 1251 (2012).
- [103] Y. ROITER, M. ORNATSKA, A. R. RAMMOHAN, J. BALAKRISHNAN, D. R. HEINE, and S. MINKO, *Nano Letters* **8**, 941 (2008).
- [104] M. DESERNO and W. M. GELBART, *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 5543 (2002).
- [105] M. DESERNO and T. BICKEL, *EPL (Europhysics Letters)* **62**, 767 (2003).
- [106] M. DESERNO, *Journal of Physics: Condensed Matter* **16**, S2061 (2004).
- [107] K. A. SMITH, D. JASNOW, and A. C. BALAZS, *J. Chem. Phys* **127**, 084703 (2007).
- [108] M. FOZNICARIC, A. IGLIC, D. M. KROLL, and S. MAY, *The Journal of Chemical Physics* **131**, 105103 (2009).

- [109] R. VÁCHA, F. J. MARTINEZ-VERACOECHEA, and D. FRENKEL, *Nano Letters* **11**, 5391 (2011).
- [110] C. HUANG, Y. ZHANG, H. YUAN, H. GAO, and S. ZHANG, *Nano Letters* **13**, 4546 (2013).
- [111] A. H. BAHRAMI, *Soft Matter* **9**, 8642 (2013).
- [112] K. YANG and Y.-Q. MA, *Aust. J Chem* **64**, 894 (2011).
- [113] C. DIETRICH, M. ANGELOVA, and B. POULIGNY, *J. Phys. II France* **7**, 1651 (1997).
- [114] J. LIU, N. LU, J. LI, Y. WENG, B. YUAN, K. YANG, and Y. MA, *Langmuir* **29**, 8039 (2013).
- [115] S. ZHANG, A. NELSON, and P. A. BEALES, *Langmuir* **28**, 12831 (2012).
- [116] K. TAHARA, S. TADOKORO, Y. KAWASHIMA, and N. HIRASHIMA, *Langmuir* **28**, 7114 (2012).
- [117] B. Y. MOGHADAM, W.-C. HOU, C. CORREDOR, P. WESTERHOFF, and J. D. POSNER, *Langmuir* **28**, 16318 (2012).
- [118] K. JASKIEWICZ, A. LARSEN, I. LIEBERWIRTH, K. KOYNOV, W. MEIER, G. FYTAS, A. KROEGER, and K. LANDFESTER, *Angewandte Chemie* **124**, 4691 (2012).
- [119] K. JASKIEWICZ, A. LARSEN, D. SCHAEFFEL, K. KOYNOV, I. LIEBERWIRTH, G. FYTAS, K. LANDFESTER, and A. KROEGER, *ACS Nano* **6**, 7254 (2012).
- [120] C. B. WILLIAMS, DAVID B.; CARTER, *Transmission Electron Microscopy*, Springer Science Business Media, 2009.
- [121] http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm .
- [122] J. PAWLEY, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer-Link, 2006.

- [123] J. L. S. MILNE, M. J. BORGNIA, A. BARTESAGHI, E. E. H. TRAN, L. A. EARL, D. M. SCHAUDER, J. LENGYEL, J. PIERSON, A. PATWARDHAN, and S. SUBRAMANIAM, *FEBS Journal* **280**, 28 (2013).
- [124] T. BAKER and R. HENDERSON, *International Tables for Crystallography* **F**, 593 (2012).
- [125] K. A. TAYLOR and R. M. GLAESER, *Science* **186**, 1036 (1974).
- [126] G. BINNIG, C. F. QUATE, and C. GERBER, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986).
- [127] M. KAPPL and H.-J. BUTT, *Particle & Particle Systems Characterization* **19**, 129 (2002).
- [128] W. A. DUCKER, T. J. SENDEN, and R. M. PASHLEY, *Nature* **353**, 239 (1991).
- [129] H.-J. BUTT, *Biophysical Journal* **60**, 1438 (1991).
- [130] Q. CHEN, H. SCHONHERR, and G. J. VANCOSO, *Soft Matter* **5**, 4944 (2009).
- [131] E. REISSER, *J. Math. Phys.* **25**, 80 (1946).
- [132] N. DELORME and A. FERY, *Phys. Rev. E* **74**, 030901 (2006).
- [133] E. LANDAU, L.D.; LIFSCHITZ, *Theory of Elasticity*, Pergamon Press: New York, 1986.
- [134] R. BORSALI and R. PECORA, *Soft Matter Characterization*, Springer-Link, 2008.
- [135] W. SCHÄRTL, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer-Link, 2007.
- [136] A. R. ALTENBERGER and J. M. DEUTCH, *The Journal of Chemical Physics* **59**, 894 (1973).
- [137] J. C. BROWN, P. N. PUSEY, and R. DIETZ, *The Journal of Chemical Physics* **62**, 1136 (1975).

- [138] A. J. JIN, D. HUSTER, K. GAWRISCH, and R. NOSSAL, *European Biophysics Journal* **28**, 187 (1999).
- [139] S. R. ARAGON and R. PECORA, *The Journal of Chemical Physics* **64**, 2395 (1976).
- [140] P. J. WYATT, *Analytica Chimica Acta* **272**, 1 (1993).
- [141] <http://www.chemie.uni-kassel.de/mmc/pub/ws0506/fskript-lichtstreuung.pdf> .
- [142] A. H. R. KOCH, G. LÉVÊQUE, S. HARMS, K. JASKIEWICZ, M. BERNHARDT, A. HENKEL, C. SÖNNICHSEN, K. LANDFESTER, and G. FYTAS, *Nano Letters* **14**, 4138 (2014).
- [143] C. YU and J. IRUDAYARAJ, *Analytical Chemistry* **79**, 572 (2007), PMID: 17222022.
- [144] C. GRAF, Q. GAO, I. SCHÜTZ, C. N. NOUFELE, W. RUAN, U. POSSELT, E. KOROTIANSKIY, D. NORDMEYER, F. RANCAN, S. HADAM, A. VOGT, J. LADEMANN, V. HAUCKE, and E. RÜHL, *Langmuir* **28**, 7598 (2012), PMID: 22524440.
- [145] S. EGLI, M. G. NUSSBAUMER, V. BALASUBRAMANIAN, M. CHAMI, N. BRUNS, C. PALIVAN, and W. MEIER, *Journal of the American Chemical Society* **133**, 4476 (2011).
- [146] A. CIOLINO, G. SAKELLARIOU, D. PANTAZIS, M. A. VILLAR, E. VALLÉS, and N. HADJICHRISTIDIS, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **44**, 1579 (2006).
- [147] K. MADHAVAN and B. S. R. REDDY, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **44**, 2980 (2006).
- [148] A. KOCH, *Interactions of Gold Nanoparticles with Polymeric Membranes*, PhD thesis, Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, 2014.

- [149] J. L. HUTTER and J. BECHHOEFER, *Review of Scientific Instruments* **64**, 1868 (1993).
- [150] IANCU, TIVOL, SCHOOLER, DIAS, HENDERSON, MURPHY, WRIGHT, LI, YU, BRIEGEL, GAN, HE, and JENSEN, *Nature Protocols* **1**, 2813 (2007).
- [151] K. P. RYAN, W. B. BALD, K. NEUMANN, P. SIMONSBERGER, D. H. PURSE, and D. N. NICHOLSON, *Journal of Microscopy* **158**, 365 (1990).
- [152] T. SAEGUSA, H. IKEDA, and H. FUJII, *Macromolecules* **5**, 359 (1972).
- [153] R. HOOGENBOOM, M. W. M. FIJTEN, and U. S. SCHUBERT, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**, 1830 (2004).
- [154] T. SAEGUSA, H. IKEDA, and H. FUJII, *Macromolecules* **6**, 315 (1973).
- [155] T. SAEGUSA, S. KOBAYASHI, and A. YAMADA, *Die Makromolekulare Chemie* **177**, 2271 (1976).
- [156] A. SALVATI, S. RISTORI, J. OBERDISSE, O. SPALLA, G. RICCIARDI, D. PIETRANGELI, M. GIUSTINI, and G. MARTINI, *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 10357 (2007).
- [157] S. WINZEN, M. BERNHARDT, D. SCHAEFFEL, A. KOCH, M. KAPPL, K. KOYNOV, K. LANDFESTER, and A. KROEGER, *Soft Matter* **9**, 5883 (2013).
- [158] Q. K. ONG and I. SOKOLOV, *Journal of Colloid and Interface Science* **310**, 385 (2007).
- [159] A. KOCH, M. BERNHARDT, and K. LANDFESTER, - -, (-).
- [160] H. M. H. M. XU, *Polymer Journal* **26**, 779 (1994).
- [161] W. . HOLLEMAN, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, volume 102, de Gruyter, 2007.
- [162] D. HOFMANN, C. MESSERSCHMIDT, M. B. BANNWARTH, K. LANDFESTER, and V. MAILANDER, *Chem. Commun.* **50**, 1369 (2014).

- [163] K.-M. JAN and S. CHIEN, *The Journal of General Physiology* **61**, 638 (1973).
- [164] S. TENZER, D. DOCTER, J. KUHAREV, A. MUSYANOVYCH, V. FETZ, R. HECHT, F. SCHLENK, D. FISCHER, K. KIOUPTSI, C. REINHARDT, K. LANDFESTER, H. SCHILD, M. MASKOS, S. K. KNAUER, and R. H. STAUBER, *Nature Nanotechnology* **8**, 772 (2013).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dasss ich diese Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die im Sinn oder Wortlaut anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Max Bernhardt

Mainz, den 15. März 2015