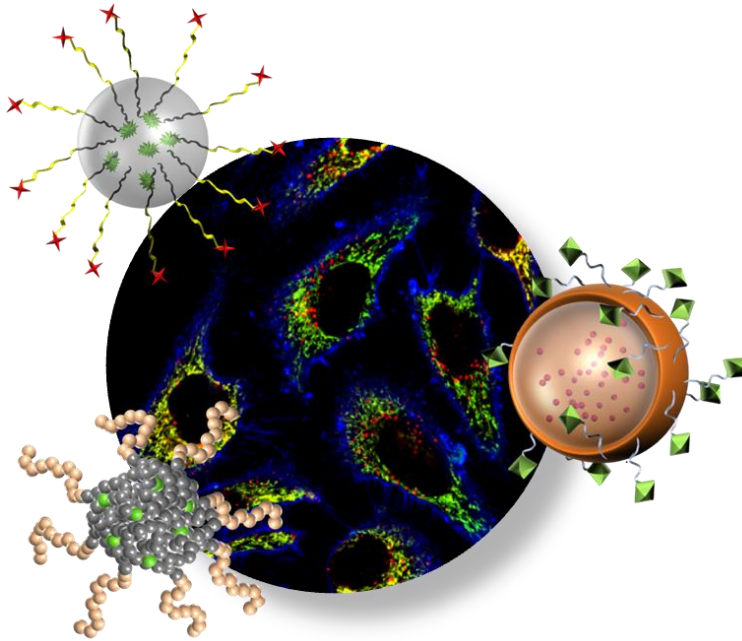


# Analyse der intrazellulären Freisetzung von Wirkstoffmodellen *via* Konfokaler Laser-Raster- Mikroskopie



## Dissertation

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der  
Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Stephanie Tomcin**

geb. in Sonneberg

Mainz, Mai 2014





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

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



**Analyse der intrazellulären Freisetzung  
von Wirkstoffmodellen *via* Konfokaler  
Laser-Raster-Mikroskopie**



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ



amtierender Dekan:

1. Gutachterin:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:



# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Motivation .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	4
2.1 Verwendete biokompatible Polymere .....	4
2.1.1 Poly( <i>n</i> -butylcyanacrylat) .....	4
2.1.2 Poly(hydroxypropylmethacrylamid) (P(HPMA)) .....	6
2.1.3 Poly-( <i>D,L</i> -Lactid) (PDLLA).....	9
2.2 Verwendete nanopartikuläre Polymersysteme .....	11
2.2.1 Nanopartikel und Nanokapseln <i>via</i> direkter und inverser Miniemulsion .....	11
2.2.2 Nanohydrogelpartikel <i>via</i> Selbstorganisation.....	14
2.3 Markierung nanopartikulärer Systeme mittels Fluoreszenzfarbstoffe.....	16
2.4 Aufnahmemechanismen der Zelle.....	18
2.5 Freisetzung der Partikelbeladung/ des Kapselinhalts .....	20
2.6 Zellkompartimente und deren Markierung .....	24
2.6.1 Mitochondrien.....	24
2.6.2 Lysosomen.....	26
2.6.3 Zellmembran .....	27
3 Methoden .....	28
3.1 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) .....	28
3.2 Durchflusszytometrie .....	30
3.3 Mikrotiterplattenleser.....	32
3.4 Datenauswertung mit Volocity® .....	32
4 Material und Durchführung .....	38
4.1 Material.....	38
4.1.1 Zelllinien.....	38
4.1.2 Nanokapseln und –partikel.....	39
4.1.3 Oligonukleotide .....	41
4.1.4 Geräte.....	41
4.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	42

4.1.6	Reagenzien, Farbstoffe und Antikörper (AK) .....	43
4.2	Durchführung .....	44
4.2.1	Synthese und Herstellungsprozesse der nanopartikulären Systeme .....	44
4.2.2	Zellkultur .....	49
4.2.3	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	50
4.2.4	Herabsetzen des mitochondrialen Membranpotentials mittels DNP.....	52
4.2.5	Durchflusszytometrie.....	52
4.2.6	FRET-Messungen .....	53
4.2.7	Toxizitätstest <i>via</i> MTS-Assay .....	54
4.2.8	Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von „Lipid Droplets“ .....	55
4.2.9	Datenauswertung mit Volocity® .....	55
5	Resultate und Diskussion .....	58
5.1	PBCA-Nanokapseln als Trägersystem für Oligonukleotide.....	58
5.1.1	Toxizitätstest auf der Grundlage eines MTS-Assays .....	59
5.1.2	Kinetikstudie über die Aufnahme der Nanokapseln und die Freisetzung Cy5- markierter Oligonukleotide.....	60
5.1.3	Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®.....	66
5.1.4	Einfluss der Kapselkonzentration auf das Aufnahmeverhalten in HeLa-Zellen	68
5.1.5	Einfluss des mitochondrialen Membranpotentials auf die Akkumulation der Oligonukleotide an Mitochondrien .....	74
5.1.6	Analyse zum Abbau der Oligonukleotide.....	80
5.1.7	Intrazellulärer Verbleib von Kapselinhalt und Hüllmaterial .....	82
5.2	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)-stabilisierte PS- und PDLLA-Nanopartikel.....	86
5.2.1	Eingesetzte Partikel.....	86
5.2.2	Toxizitätstest auf der Grundlage eines MTS-Assays .....	87
5.2.3	Aufnahmestudien Oregon Green-markierter Nanopartikel in HeLa-Zellen .....	88
5.2.4	Kinetikstudie zur Freisetzung von PMI als Wirkstoffmodell aus HPMA-basierten Nanopartikeln in HeLa-Zellen .....	89
5.2.5	Aufnahme von PMI in „Lipid Droplets“ .....	92
5.2.6	Kinetikstudie in HeLa-Zellen mit doppelt kovalent markierten Nanopartikeln ...	96



5.2.7	Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®.....	98
5.2.8	Varianz der Kettenlänge von LMA im Hinblick auf die Stabilisation der Nanopartikel.....	101
5.2.9	Übersicht über einen möglichen Verlauf des Aufnahmewegs eines hydrophoben Wirkstoffs.....	103
5.3	Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA .....	106
5.3.1	Eingesetzte Nanohydrogelpartikel.....	106
5.3.2	Intrazellulärer Verbleib der Nanohydrogelpartikel nach der Aufnahme in HeLa-Zellen .....	108
5.3.3	Kinetikstudie zur Anreicherung der Partikel in Lysosomen .....	109
5.3.4	Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®.....	111
5.3.5	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide als Modellsystem für siRNA .....	113
5.3.6	Wiederholung der Kinetikstudie mit Partikeln, die Knockdown aufwiesen.....	114
5.3.7	Quantitative Auswertung der zweiten Kinetikstudie einschließlich Vergleich beider Studien mittels Volocity®.....	116
6	Zusammenfassung.....	119
7	Summary.....	121
8	Anhang.....	123
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	123
8.2	Symbole.....	124
9	Literaturverzeichnis .....	125
	Danksagung .....	138
	Publikationen.....	139
	Eidesstattliche Erklärung .....	140
	Lebenslauf.....	141



## 1 Einleitung und Motivation

Was ist „nano“ und wo kommt „nano“ vor? Das sind Fragen, die immer wieder in der breiten Bevölkerung aufkommen und die natürlich der Aufklärung bedürfen. Die Frage „Was ist „nano“?“ kann sehr schnell und einfach beantwortet werden. Nanomaterialien sind Strukturen, die in mindestens einer Dimension (Höhe, Breite oder Länge) einen Größenbereich von 1-100 nm aufweisen, wobei das griechische Wort *nános* (Zwerg) für die Namensgebung verantwortlich ist. Bei der Erforschung von Nanomaterialien stützt man sich also auf Objekte, die 10.000-fach dünner als das menschliche Haar sind und die sich in ihren Eigenschaften und Funktionen deutlich von denselben Materialien in größeren Dimensionen unterscheiden. Gerade diese neuen Funktionen und Eigenschaften bieten Potential für neuartige Anwendungen, die viele Bereiche des täglichen Lebens vereinfachen können. Beispielsweise werden synthetische Nanopartikel aus Titandioxid oder Zinkoxid in Sonnencremes verwendet, um einen besseren UV-Schutz zu erzielen. Nanoskaliges Titandioxid wird auch in der Bekleidungsindustrie eingesetzt, um so einen Lichtschutzfaktor quasi direkt in die Kleidung einzubauen. In medizinischen Gegenständen werden Silber-Nanopartikel als antibakterielle Komponente eingesetzt und nanoskaliges Eisenoxid findet Anwendung in der Kernspintomografie als bildgebendes Kontrastmittel.<sup>1</sup> Daneben gibt es aber auch natürlich vorkommende Nanomaterialien wie etwa Rußpartikel. Industrieruß (Carbon Black) zum Beispiel wird bereits seit über hundert Jahren in der Automobilindustrie verwendet, um Autoreifen mechanisch zu verstärken und so deren Verschleiß zu verringern.<sup>2</sup> Er dient aber auch als Schwarzpigment in der Kosmetikindustrie wie etwa bei der Herstellung von Mascara.<sup>3</sup> Aber auch in der Lebensmittelindustrie kommt die auf Siliziumdioxid, Titandioxid oder Magnesiumoxid basierende Nanotechnologie zum Einsatz, beispielsweise als Verdickungsmittel in Tomatenketchup oder als Rieselhilfe in Salz und Fertigsuppen.<sup>4</sup>

Die Nanotechnologie birgt vor allem ein enormes Potential für medizinische Anwendungen in sich. So können die Vorteile von nanopartikulären Systemen als Wirkstoffträger beispielsweise in der Krebstherapie ausgenutzt werden. Wirkstoffe können durch den Einsatz von nanoskaligen Trägersystemen vor Abbaureaktionen im Körper geschützt werden, was bei der konventionellen Verabreichung von Wirkstoffen oftmals nicht realisiert werden kann. Außerdem ist es möglich, Wirkstoffe, die eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, effektiv zu transportieren. Durch eine Vielfalt an Modifikationen der Oberfläche des nanopartikulären Trägersystems können bestimmte Zielzellen oder Zielgewebe erreicht werden, wodurch eine Wirkstofffreisetzung nur am Zielort stattfindet. Dadurch wird die Wirksamkeit eines Wirkstoffs erhöht und Nebeneffekte, die sich auf gesundes Gewebe auswirken, minimiert. Weitere Vorteile gegenüber einer konventionellen Darreichungsform von Wirkstoffen stellen die Möglichkeiten der Überwindung körpereigener Barrieren wie die

Blut-Hirn-Schranke dar oder einer Erhöhung der Blutzirkulation, so dass der Wirkstoff länger im Körper verfügbar bleibt.<sup>5</sup>

Natürlich kommt bei einer Anwendung von Nanopartikeln als Wirkstoffträger ganz besonders die Frage nach dem Verbleib des Trägermaterials und des Wirkstoffs auf. Auf welche Art und Weise der Wirkstoff freigesetzt wird und wie überhaupt eine Aufnahme des Trägersystems erfolgen kann, sind weitere Fragen, die aufgeklärt werden müssen. Die letztgenannte Fragestellung lässt sich wohl am leichtesten beantworten. Nanopartikel und Viren weisen ähnliche Dimensionen auf.<sup>6</sup> Es ist bekannt, dass Viren *via* Endozytose von Zellen internalisiert werden und dienen dadurch auch als wertvolle Untersuchungsobjekte, um Endozytoseprozesse zu erforschen.<sup>7-8</sup> Der gleiche energiegetriebene Prozess der Endozytose, über den Zellen auch Nährstoffe aufnehmen, ist für die Aufnahme von Nanopartikeln verantwortlich.<sup>9</sup> Durch eine entsprechende Modifikation der Oberfläche von nanopartikulären Trägersystemen, wie etwa der Anbindung von Rezeptormolekülen, ist es möglich, ganz bestimmte Zielzellen anzusteuern, was essentiell ist, um einen Wirkstoff genau dahin zu transportieren, wo er gebraucht wird. Folat oder Aptamere dienen oftmals als Liganden, um eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in bestimmte Zellen zu erwirken.<sup>10-11</sup> Doch nicht nur bestimmte Liganden an Nanopartikeln entscheiden über eine Interaktion mit bzw. eine Aufnahme in Zellen, sondern auch das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, Oberflächenladung, Hydrophobizität, Größe, Form oder die mechanische Flexibilität der nanopartikulären Trägersysteme.<sup>12</sup>

Nach der Aufnahme muss eine Freisetzung des Wirkstoffs garantiert werden, um eine effektive Therapie zu gewährleisten. Je nach Zielstellung ob ein bestimmter Zelltyp oder bestimmte intrazelluläre Bereiche angesteuert werden sollen, können verschiedene Konzepte zur Freisetzung angewendet werden. Nutzt man beispielsweise eine vor allem in Krebszellen oder deren unmittelbarer Umgebung erhöhte Konzentration von Enzymen aus, so kann eine entsprechende ins Trägermaterial eingebaute Proteinsequenz durch diese Enzyme abgebaut werden, wodurch eine Freisetzung des Wirkstoffs erzielt wird.<sup>13</sup> Um auf intrazellulärer Ebene Wirkstoffe oder Nukleinsäure-Sequenzen zu bestimmten Organellen wie etwa den Mitochondrien zu transportieren, können spezielle angebundene Proteinsequenzen oder lipophile Kationen ausgenutzt werden, welche gezielt Mitochondrien ansteuern, so dass Krankheiten, die durch einen Defekt in diesen Organellen ausgehen, bekämpft werden können.<sup>14</sup>

Doch was passiert mit den Nanopartikeln, nachdem sie aufgenommen wurden und ihre Fracht freigesetzt haben? Eine Anreicherung von Trägermaterial im Körper soll natürlich vermieden werden. Deswegen kommen vor allem bioabbaubare Substanzen wie Polyester

als Trägermaterial in Frage. Solche Materialien werden im Körper durch Enzyme abgebaut und über die Nieren wieder ausgeschieden.

Gerade wenn nanopartikuläre Systeme Anwendung in medizinischen Bereichen als sogenannte „Nanomedizin“ finden sollen, ist eine umfangreiche Untersuchung und Risikobewertung unerlässlich. Präklinische und klinische Studien erforschen unter anderem die Toxizität neuer Wirkstoffe. Zulassungsbehörden wie die Food and Drug Administration (FDA) in den USA oder die European Medicines Agency (EMA) im europäischen Raum entscheiden letztendlich, ob ein neues Medikament auf den Markt kommt. Diese „Hürden“ müssen auch Nanopartikel, die therapeutische Anwendung finden sollen, durchlaufen. Als Vertreter solcher Nanopartikel befinden sich beispielsweise Liposomen oder bioabbaubare Block-Copolymere, die Mizellen ausbilden und als Wirkstoff Doxorubicin oder Paclitaxel enthalten, aktuell in Phase IV klinischer Studien.<sup>15</sup>

Diese Arbeit beschäftigt sich mit potentiellen nanopartikulären Trägersystemen für Wirkstoffe, deren Bestandteile biokompatibel, bioabbaubar und zum Teil FDA-geprüft sind. *In vitro*-Versuche, die den ersten Teil präklinischer Studien darstellen, sollen die Unbedenklichkeit der eingesetzten Materialien hinsichtlich einer möglichen Zytotoxizität zeigen. Anhand von fluoreszenzmarkierten Wirkstoffmodellen, die in den Nanokapseln oder -partikeln eingeschlossen sind, soll eine Freisetzung von Wirkstoffen nachgewiesen werden, was anhand der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie dokumentiert wird. Desweiteren soll auch die Frage nach dem intrazellulären Verbleib des polymeren Trägermaterials, das ebenfalls fluoreszenzmarkiert ist, innerhalb der Zellen aufgeklärt werden. Auf diese Art und Weise soll gezeigt werden, dass ausschließlich die Wirkstoffmodelle an ihren bestimmten Zielort gelangen, das Trägermaterial selbst aber an anderen Regionen bzw. in anderen Organellen verbleibt, die zum Abbau der polymeren Matrix beitragen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Verwendete biokompatible Polymere

Im Hinblick auf eine Anwendung als Trägersysteme für den Wirkstofftransport sollen die eingesetzten Polymere nicht nur biokompatibel und nach Möglichkeit bioabbaubar sein, sondern auch das Einsetzen einer Entzündungsreaktion oder einer Immunantwort vermeiden. Ein gut untersuchtes Beispiel eines biokompatiblen sowie bioabbaubaren Polyesters ist das Copolymer Poly(lactid)-co-Poly(glycolid) (PLGA), welches FDA (Food and Drug Administration, unterliegt dem Gesundheitsministerium der USA) geprüft ist.<sup>16-17</sup> PLGA wird nach Verabreichung im Körper zu nicht-toxischen Nebenprodukten abgebaut und diese über die Nieren ausgeschieden. Doch da diese Nebenprodukte azide sind, können nicht-spezifische Entzündungserscheinungen ausgelöst werden. PLGA selbst kann als relativ hydrophobe Substanz ebenfalls Entzündungsreaktionen hervorrufen.<sup>5</sup> In den nachfolgenden Abschnitten werden die Polymere beschrieben, die hauptsächlich für die Herstellung der in dieser Arbeit eingesetzten nanopartikulären Systeme verwendet wurden. Diese Polymere, welche zum Teil in klinischen Studien eingesetzt werden, sind biokompatibel und eignen sich im Besonderen zu Herstellung von Nanokapseln bzw. Nanopartikeln, welche als Modellsysteme zum Transport für Wirkstoffe eingesetzt wurden. Um dem Auftreten von Entzündungsreaktionen oder Immunantworten vorzubeugen,<sup>18</sup> wurde darauf geachtet, die Oberfläche der potentiellen Wirkstoffträger hydrophil zu gestalten. Eine hydrophile Oberfläche erweist sich auch als Vorteil, um die Blutzirkulation der nanopartikulären Systeme zu verlängern und eine Aggregation mit Plasmaproteinen einzuschränken.<sup>19</sup> In den nachfolgenden Abschnitten werden die Polymere, die im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung von Polymer-Nanopartikeln bzw. -Nanokapseln verwendet wurden, im Detail erklärt.

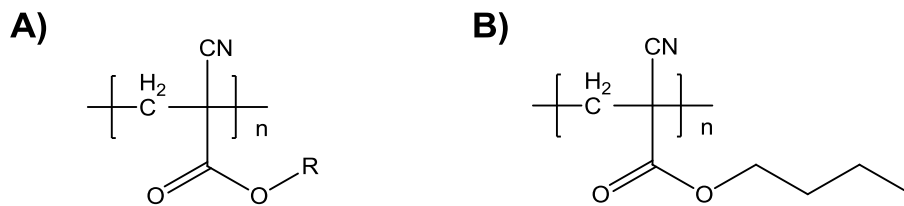
#### 2.1.1 Poly(*n*-butylcyanacrylat)

Die Voraussetzungen der Biokompatibilität und der Bioabbaubarkeit werden bei der Verwendung von Poly(alkylcyanacrylaten) (PACA, Abbildung 1 A)) erfüllt. Sie kommen zum Beispiel auch als chirurgischer Kleber zum Einsatz.<sup>20</sup> Das Monomer 2-Octylcyanacrylat, welches unter dem Handelsnamen Dermabond® bekannt ist, wird seit langem als Gewebekleber beim Wundverschluss verwendet, da es bei Kontakt mit schwachen Basen (z: B. Wasser bei pH 7) sofort polymerisiert und die Wunde schnell verschließt.<sup>21</sup> Die Eigenschaften der hochreaktiven Cyanacrylat-Monomere werden nicht nur in der Medizin ausgenutzt. Nahezu alle Superkleber bzw. Sekundenkleber enthalten Cyanacrylate wie zum Beispiel Loctite® (Henkel).<sup>22</sup> Sogar in der Forensik wird die Superkleber-Methode

angewandt, um Fingerabdrücke mittels Ethylcyanacrylat, welches als Dampf versprüht wird, sichtbar zu machen.<sup>23</sup>

PACA-Nanopartikel wurden ebenfalls genutzt, um die Multiresistenz auf Wirkstoffe (*engl.* multi drug resistance, MDR) bei Tumoren zu überwinden und konnten damit auch schon in klinischen Studien bis Phase II eingesetzt werden.<sup>24</sup>

Es ist bekannt, dass die Wahl der Alkylkettenlänge entscheidend die Bioverträglichkeit der entsprechenden PACA beeinflusst. Es gilt: je kürzer die Alkylkette ist, desto toxischer ist der Einfluss auf Zellen aufgrund der Abbaukinetik.<sup>25-27</sup> Bei der Synthese der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Nanokapseln wurde das Polymer Poly(*n*-butylcyanacrylat) (PBCA, Abbildung 1 B)) gewählt, da das Monomer Butylcyanacrylat (BCA) zum einen sehr schnell polymerisiert, wenn es in Kontakt mit Wasser (pH = 7) kommt, was besonders wichtig für die Herstellung der Kapseln ist. Zum anderen wurde gezeigt, dass Abbauprodukte eines Polymers mit längeren Seitenketten im Vergleich zu denen der kurzkettigen Analoga weniger toxisch sind.<sup>28</sup>



**Abbildung 1: Allgemeine Strukturformeln der Poly(alkylcyanoacrylate) (A) und im Speziellen von Poly(*n*-butylcyanoacrylat) (B).**

Die in dieser Arbeit verwendeten PBCA-Nanokapseln wurden mittels inverser Miniemulsionstechnik hergestellt, die es erlaubt, auch sensitive, biologisch aktive Moleküle wie etwa Oligonukleotide (Oligos) im wässrigen Medium zu verkapseln und aufgrund des intrazellulären Abbaus der PBCA-Hülle eine Freisetzung der gleichen zu gewährleisten.<sup>29</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass komplexe Enzym-Reaktionen wie die DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) erfolgreich in PBCA-Nanokapseln, die als Nanocontainer bezeichnet wurden, durchgeführt werden können.<sup>30</sup> Daneben ist gezeigt worden, dass mit Hilfe von PBCA-Nanopartikeln Wirkstoffe wie Doxorubicin die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.<sup>31</sup>

Der Abbau von PBCA, der hauptsächlich durch Esterasen *via* Hydrolyse der Esterbindungen der Seitenketten erfolgt, wird ausführlich in Kapitel 5.1.2 diskutiert. Es sei an dieser Stelle aber erwähnt, dass aufgrund des enzymatischen Abbaus der primäre Alkohol Butanol und Poly(2-cyanacrylsäure) entstehen, wobei angenommen wird, dass die Polymerhauptkette immer hydrophiler wird, bis sie schließlich wasserlöslich ist.<sup>32</sup> Diese wasserlöslichen Produkte können *in vivo* über die Nieren ausgeschieden werden.<sup>26</sup>

### 2.1.2 Poly(hydroxypropylmethacrylamid) (P(HPMA))

Als repräsentatives Beispiel eines biokompatiblen Block-Copolymers, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wird *N*-(2-Hydroxypropylmethacrylamid) (HPMA) näher erläutert. HPMA-Wirkstoff-Konjugate wurden erstmals 1979 in der Gruppe um J. Kopeček entwickelt,<sup>33</sup> welche sich an den Polymer-Wirkstoff-Konjugaten von H. Ringsdorf orientierten.<sup>34</sup> Bis heute durchliefen solche Konjugate, wie beispielsweise die Kombinationen HPMA-Copolymer/Doxorubicin,<sup>35-36</sup> HPMA-Copolymer/Paclitaxel<sup>37</sup> oder HPMA-Copolymer/Dach-Platin,<sup>38</sup> verschiedene Phasen klinischer Studien zur Anwendung als polymere Therapeutika gegen Krebserkrankungen. Doch HPMA ist nicht nur als Bestandteil dieser neuen Form von „Nanomedizin“ bekannt, sondern bietet als Homopolymer ebenfalls Potential als Plasmaexpander.<sup>39</sup> Weitere Beispiele für die Verwendung HPMA-basierter Konjugate sind der Einsatz bei der Bekämpfung von Osteoporose<sup>40</sup> oder rheumatischer Arthritis.<sup>41</sup>

In Abbildung 2 ist die Strukturformel des Homopolymers Poly(*N*-(2-hydroxypropylmethacrylamid)) (P(HPMA)) dargestellt.

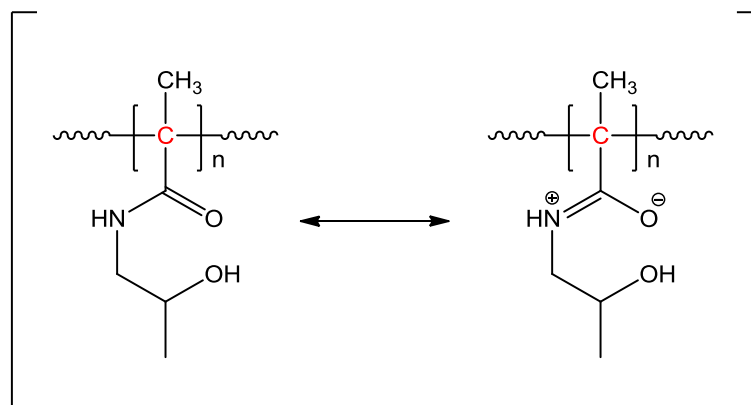


Abbildung 2: Darstellung der Strukturformel von P(HPMA), welches über Mesomerie stabilisiert wird. Das  $\alpha$ -C-Atom ist rot markiert.



Das hydrophile Polymer ist nicht nur biokompatibel, sondern zeigt gleichfalls eine hydrolytische Stabilität der Seitenketten aufgrund der Substitution am  $\alpha$ -C-Atom (rot in Abbildung 2) und der Mesomeriestabilisierung der N-substituierten Amidbindung.<sup>42</sup> Jedoch bringt vor allem die Stabilität des Polymerrückgrats den Nachteil mit sich, dass P(HPMA) nicht bioabbaubar ist, was zu einer Akkumulation in Zellen führen kann. Diese kann wiederum durch die Verwendung von Polymeren mit einer Molaren Masse <40.000 g/mol ausgeschlossen werden, da bei diesen die Eliminierung über die glomeruläre Filtration der Nieren gewährleistet werden kann.<sup>43</sup> Bei der Synthese der in dieser Arbeit verwendeten HPMA-basierten Block-Copolymere wurde deshalb das Molekulargewicht auf 10.000 g/mol eingestellt.

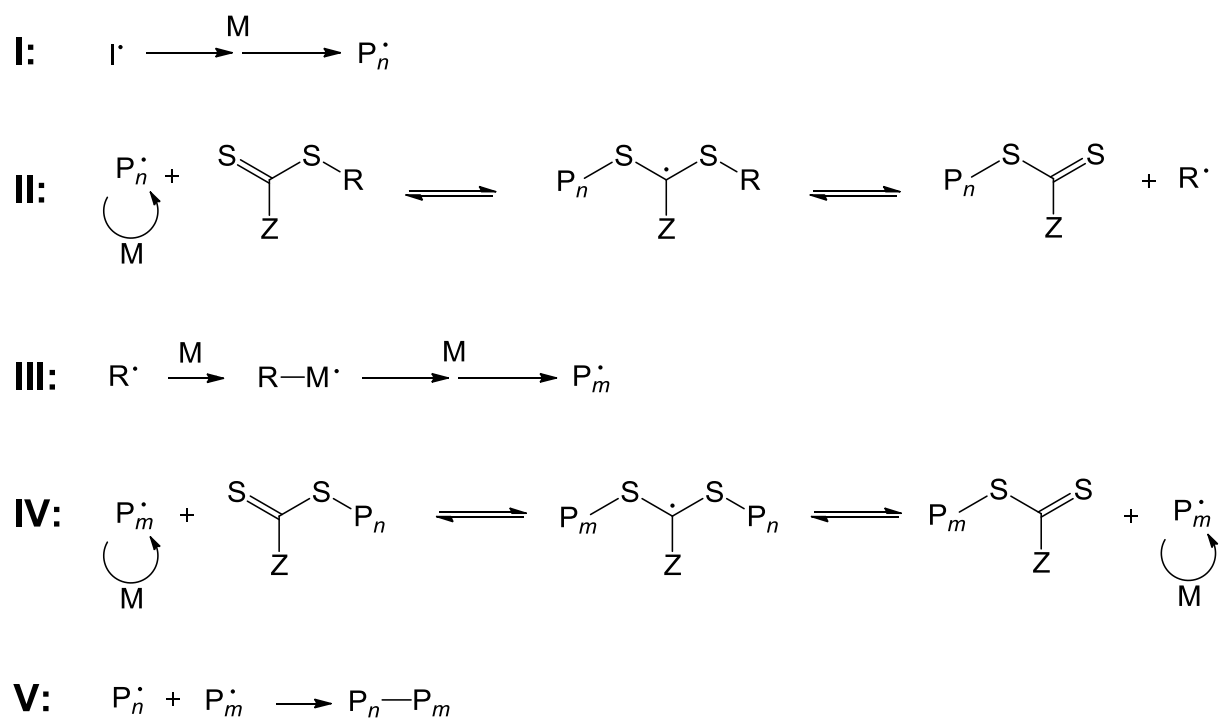
Eine intrazelluläre Wirkstofffreisetzung aus HPMA-Konjugaten kann zum Beispiel mittels hydrolytisch spaltbarer Bindung zwischen Wirkstoff und HPMA-Copolymer herbeigeführt werden, die aufgrund des sauren pH-Wertes in Lysosomen gespaltet wird, wie es beispielsweise bei HPMA/Doxorubicin-Konjugaten angewandt wurde.<sup>41</sup> Eine weitere Möglichkeit bedient sich der reduktiv spaltbaren Disulfidbindungen oder auch der Anwendung eines proteolytisch spaltbaren Spacers, wie es an HPMA-basierten Konjugaten mit photosensitiven Substanzen durchgeführt wurde.<sup>44</sup>

Als typische Aufnahmewege dieser Konjugate sind hauptsächlich die passive Akkumulation im Tumorgewebe aufgrund des Effekts der erhöhten Permeabilität und Retention (*engl.* enhanced permeation and retention effect, EPR-Effekt) zu nennen<sup>45</sup> sowie die rezeptorvermittelte Endozytose als aktive, zielgerichtete Aufnahme durch die Anbindung Tumorzell-spezifischer Liganden wie bestimmte Antikörper, Peptide oder Kohlenhydrate.<sup>42</sup> Auf weitere Aufnahmemöglichkeiten wird genauer in Kapitel 2.4 eingegangen.

Die HPMA-basierten Block-Copolymere, die für die Studien dieser Arbeit verwendet wurden, sind zur kolloidalen Stabilisierung von Polymer-Nanopartikeln eingesetzt worden, um gängige kommerzielle Tenside wie Natriumdodecylsulfat (*engl.*: sodium dodecyl sulfate, SDS) ersetzen zu können. SDS als konventionelles Tensid wirkt in hohen Konzentrationen zelltoxisch und wird zum Beispiel zum Stoppen zellspezifischer Reaktionen durch Abtöten der Zellen verwendet.<sup>46</sup> Die gut untersuchten biokompatiblen HPMA-basierten Block-Copolymere bieten als amphiphile Polymere ein hohes Potential zur Stabilisierung von Nanopartikeln und können toxisch wirkende Tenside ersetzen. Dies bringt außerdem den Vorteil mit sich, auf zeitintensive Aufreinigungsschritte (z. B. Dialyse) nach der Nanopartikelherstellung verzichten zu können. Basierend auf der Synthesemethode mittels reversibler Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (*engl.*: reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT), welche erstmals 2005 erfolgreich für HPMA angewendet wurde,<sup>47</sup> ist es möglich Endgruppenfunktionalisierungen einzuführen, wenn die

Dithio-Gruppe erhalten bleibt. Diese Modifizierbarkeit kann weiter ausgebaut werden, indem die RAFT-Polymerisation in Kombination mit Reaktivestern angewandt wird. Dadurch kann eine Vielzahl an Funktionalitäten eingebracht werden, die unter anderem eine rezeptorvermittelte Endozytose oder die Detektion der Nanopartikel mittels angebundener Fluorophore ermöglichen. Die Synthese der HPMA-Block-Copolymere sowie die Herstellung der Nanopartikel wurden von Annette Kelsch durchgeführt.

Im Folgenden soll kurz auf die RAFT-Polymerisation eingegangen werden, da sie die Grundlage zur Synthese der in dieser Arbeit eingesetzten biokompatiblen Block-Copolymere darstellt. Mittels RAFT-Polymerisation als eine Form der kontrollierten radikalischen Polymerisation ist es möglich, die Polydispersität bzw. die Molmasse  $M_n$  der Polymere zu kontrollieren.<sup>48-49</sup> Abbildung 3 zeigt schematisch den Reaktionsmechanismus einer RAFT-Polymerisation.



**Abbildung 3: Darstellung des Reaktionsmechanismus einer RAFT-Polymerisation (I=Initiator, M=Monomer). I: Initiierung, II: Reversibler Kettentransfer, III: Reinitiierung, IV: Ketten-Gleichgewicht, V: Kettenabbruch. Modifiziert nach.<sup>49-50</sup>**

Zu Beginn werden mittels Einsatz eines Initiators wie etwa 2,2'-Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) Radikale generiert, die durch Anlagerung an Monomere Monomerradikale entstehen lassen, die weiter zu wachsenden Polymerketten  $P_n^{\cdot}$  reagieren (Abbildung 3, Schritt I). Im weiteren Verlauf entsteht unter Verwendung eines Kettentransferreagenzes (*engl.* chain transfer

agent, CTA), welches zum Beispiel ein Dithioester sein kann, aus dem wachsenden Radikal ein polymeres Thiocarbonylthiosystem, woraus sich die schlafende Thiocarbonylthio-Spezies und ein freies Radikal  $R^{\bullet}$  bildet (Abbildung 3, Schritt II). Dieses Radikal erzeugt mit weiteren Monomeren neue aktive wachsende Radikale  $P_m^{\bullet}$  (Abbildung 3, Schritt III), welche mit der schlafenden Thiocarbonylthio-Spezies ein Gleichgewicht eingehen (Abbildung 3, Schritt IV). Der Kettenabbruch erfolgt durch das Zusammenlagern zweier Radikale wie beispielsweise die der wachsenden Ketten (Abbildung 3, Schritt V).

Die so erhaltenen Polymere, die eine enge Polydispersität aufweisen und deren aktive Dithio-Funktionalität bestehen bleibt, können nach Reaktivierung u. a. als Vorstufe für die Darstellung von Block-Copolymeren genutzt werden.<sup>49</sup> Durch den Einsatz eines CTAs wird gewährleistet, dass die Konzentration an freien Radikalpolymerenden gering bleibt und die Polymerisation langsam und kontrolliert ablaufen kann.

Durch die Anwendung der RAFT-Polymerisation auf Reaktivester-Monomere können modifizierbare Polymere hergestellt werden, da die Reaktivester-Polymere mittels polymeranaloger Reaktionen zu wohldefinierten Polymeren mit neuen Funktionalitäten umgesetzt werden können.<sup>51-52</sup>

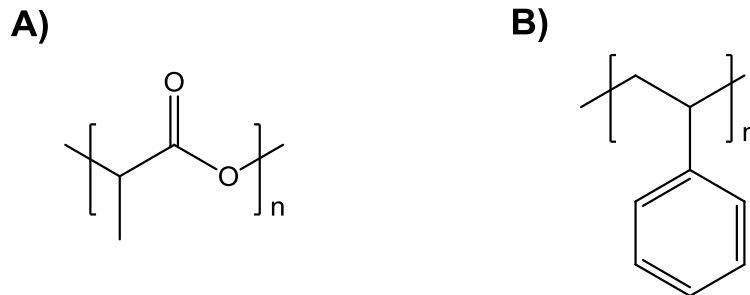
Die RAFT-Technik kann auf eine Vielzahl von Monomeren angewendet werden und hat ein hohes Potential, um biomedizinisch relevante Materialien herzustellen, wie beispielsweise HPMA-basierte Polymere, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Doch muss darauf geachtet werden, dass die erhaltenen Polymere frei von Dithiobenzoat-Endgruppen sind, da diese Dithioester in vielen Zelllinien toxische Effekte hervorrufen und die Zellviabilität entscheidend beeinflussen.<sup>53</sup>

Die Synthese der verwendeten Polymere beinhaltete die vollständige Umsetzung der Dithiobenzoat-Endgruppen sowie die vollständige Umsetzung der Reaktivester. Beides wurde mittels Charakterisierungsmethoden überprüft wie etwa der  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie, so dass toxische Effekte aufgrund von Rückständen beider Spezies im Vorfeld ausgeschlossen werden konnten.

### 2.1.3 Poly-(D,L-Lactid) (PDLLA)

In Anlehnung an natürlich vorkommende Polymere wie Polysaccharide<sup>54</sup> (Zellulose, Stärke, Hyaluronsäure etc.) oder Polyester<sup>55</sup> (z. B. Poly( $\beta$ -Hydroxybutyrat)) müssen biologisch abbaubare Polymere die Eigenschaft mit sich bringen, durch natürlich vorkommende Enzyme abgebaut werden zu können.<sup>56</sup> Die Bioabbaubarkeit kann definiert werden als „allmählicher Abbau eines Materials durch eine spezifische biologische Aktivität“.<sup>56</sup>

Als repräsentatives Beispiel der großen Gruppe der bioabbaubaren Polyester wird Poly-D,L-Lactid (PDLLA, Abbildung 4, A)) näher beschrieben, da dieses hauptsächlich zur Herstellung der Nanopartikel eingesetzt worden ist, welche durch HPMA-basierte Block-Copolymere stabilisiert wurden.



**Abbildung 4: Strukturformeln von PDLLA (A)) als Beispiel eines bioabbaubaren Polymers und Polystyrol (B)) als Beispiel eines bioinerten Polymers.**

Die Möglichkeit, Polylactid biologisch im menschlichen Körper abzubauen, wurde 1966 zum ersten Mal beobachtet.<sup>57</sup> Aufgrund der Eigenschaften der Biokompatibilität und vor allem der Bioabbaubarkeit wird Polylactid vielfältig als Implantat-Material<sup>58-59</sup> verwendet. Aber auch der Einsatz von Mikropartikeln<sup>60</sup> und Polymer-Wirkstoff-Konjugaten<sup>61</sup> ist bekannt. Da es sich bei PDLLA um einen aliphatischen, hydrophoben Polyester handelt, der außerdem eine hohe Kristallinität aufweist, wird es relativ langsam biologisch abgebaut. Um einen schnelleren Abbau zu gewährleisten, werden oftmals Copolymere mit anderen Polyestern verwendet wie beispielsweise das bereits erwähnte PLGA, da durch die Copolymerisation die physikochemischen und mechanischen Eigenschaften des herzustellenden Polymers gesteuert werden können (z. B. Molekulargewichte, Kristallinität), wodurch auch der enzymatische Abbau beeinflusst werden kann.<sup>62</sup> Ein schnellerer Abbau kann ebenfalls erzielt werden, indem die Oberfläche, d. h. die Angriffsfläche, für den Abbau vergrößert wird. Dies kann zum Beispiel, wie es auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde, mittels Einsatz von PDLLA-basierten Nanopartikeln realisiert werden.

Alle bioabbaubaren Polymere weisen hydrolysierbare Bindungen auf, weshalb der Abbau der Polyester einer pH-abhängigen hydrolytischen Spaltung unterliegt.<sup>63</sup> Hauptsächlich wird jedoch die Spaltung, wie bereits erwähnt, durch Enzyme (z. B. Esterasen) herbeigeführt.<sup>62</sup> Dabei sind zwei Möglichkeiten des Abbaus zu nennen, die Zersetzung der Gesamtmasse (*engl.* bulk erosion) und der Abbau an der Oberfläche (*engl.* surface erosion).<sup>64</sup> Bei PDLLA ist davon auszugehen, dass der enzymatische Abbau aufgrund der hohen Kristallinität hauptsächlich an der Oberfläche erfolgt.<sup>62</sup>

Da sowohl bei PDLLA als auch bei HPMA-basierten Block-Copolymeren auf klinische Untersuchungen zurückgegriffen werden kann,<sup>65-66</sup> sind hauptsächlich diese Polymere für die Herstellung der untersuchten Partikel verwendet worden. Dabei bildete das PDLLA Polymer-Nanopartikel, in deren Polymermatrix hydrophobe Substanzen eingeschlossen werden konnten. Das eingesetzte HPMA-basierte Block-Copolymer zeigte ein amphiphiles Verhalten und ersetzte die bei der Partikelherstellung üblicherweise verwendeten Tenside wie SDS.

Allerdings musste bei manchen Studien aufgrund der Komplexität der Synthese auf bioinerte Polymere wie Polystyrol (PS) zurückgegriffen werden (Abbildung 4). Polystyrol kann nicht biologisch abgebaut werden, weist jedoch die Eigenschaft der Biokompatibilität auf und wurde bereits in vielen Zellstudien als PS-Nanopartikel verwendet.<sup>67-69</sup> Diese wurden auch in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem in Verbindung mit HPMA-basierten Block-Copolymeren eingesetzt.

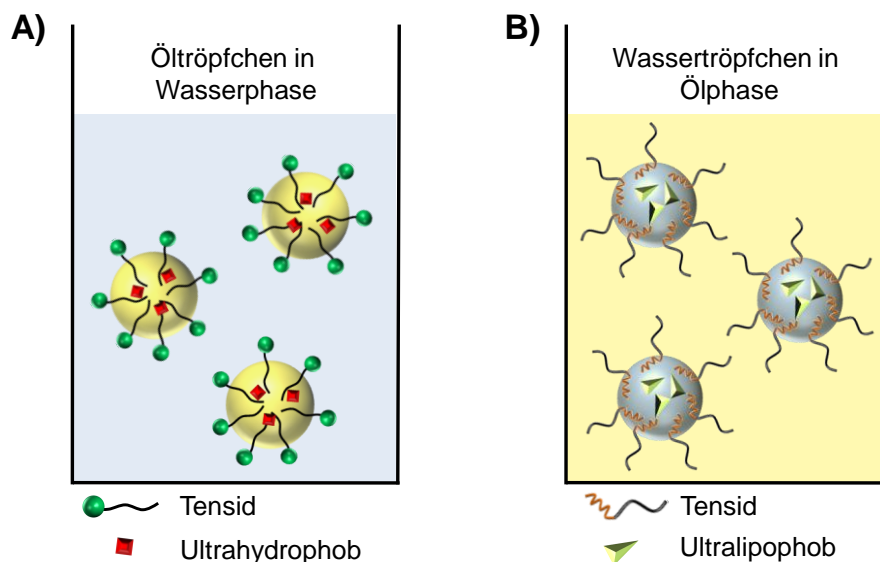
## 2.2 Verwendete nanopartikuläre Polymersysteme

Um als nanopartikulärer Wirkstoffträger im Bereich injizierbarer Nanomaterialien in Betracht zu kommen, muss ein System die vorzeitige natürliche Eliminierung zum einen über die renale Ausscheidung und zum anderen durch das mononukleär-phagozytierende System (MPS) überwinden.<sup>15</sup> Dafür sollten die nanopartikulären Systeme größer als 10 nm sein, um die Ausscheidung über die Nieren zu verhindern,<sup>70</sup> und kleiner als 500 nm, um dem MPS zu entgehen.<sup>71</sup> Außerdem muss beachtet werden, dass die nanopartikulären Systeme keine toxischen Effekte hervorrufen und eine Freisetzung des Wirkstoffs gewährleistet werden kann. Für die Anwendung als Wirkstofftransporter stehen neben den bereits erwähnten Polymer-Wirkstoff-Konjugaten auch viele andere Trägersysteme im Nanometerbereich zur Verfügung, Wirkstoffe in Zellen zu transportieren. Dazu zählen beispielsweise Liposomen,<sup>72</sup> Polymersomen,<sup>73</sup> Dendrimere,<sup>74</sup> Kohlenstoff-Nanoröhren<sup>75</sup> oder auch anorganische<sup>76</sup> sowie polymere Nanopartikel<sup>77</sup> und Nanokapseln.<sup>78</sup> Auf polymere Nanopartikel sowie Nanokapseln wird nachfolgend im Besonderen eingegangen, da diese als Modellsysteme für die Freisetzung von Wirkstoffen aus nanopartikulären Systemen untersucht wurden. Der Fokus liegt dabei auf dem Herstellungsprozess in Miniemulsion. Durch diesen Prozess konnte gewährleistet werden, dass Partikel bzw. Kapseln mit Größen zwischen 100 und 300 nm hergestellt werden konnte. Alle in dieser Arbeit verwendeten nanopartikulären Systeme sowie deren Komponenten wurden durch Kooperationspartner hergestellt.

### 2.2.1 Nanopartikel und Nanokapseln *via* direkter und inverser Miniemulsion

Der Miniemulsionsprozess kann äußerst vielseitig im Hinblick auf die Herstellung von Nanopartikeln und Nanokapseln angewendet werden. Neben der Möglichkeit, verschiedene

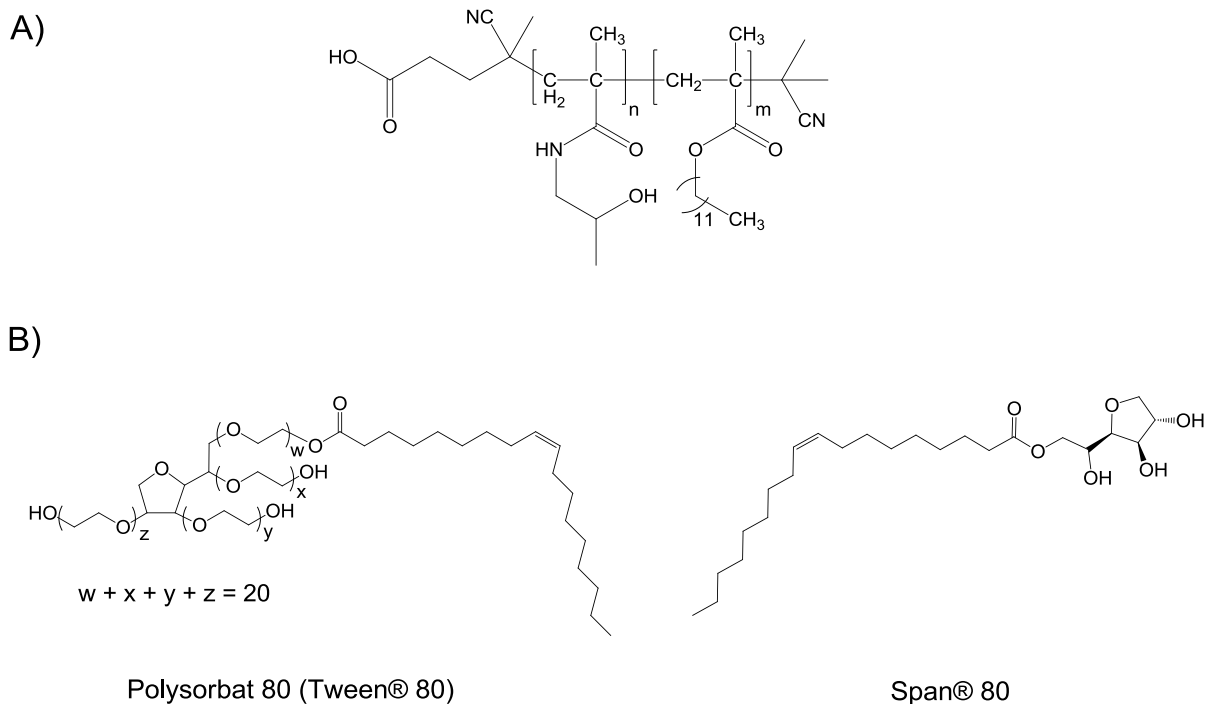
Polymerisationsmethoden durchführen zu können wie etwa Polyadditionen, Polykondensationen oder anionische sowie radikalische Polymerisationen, um nur einige zu nennen, bietet der Miniemulsionsprozess ein breites Spektrum der Verkapselung hydrophober sowie hydrophiler Feststoffe und Flüssigkeiten an.<sup>79</sup> Die generierten Miniemulsionssysteme können in „direkte“ und „inverse“ Miniemulsionen eingeteilt werden. Dabei repräsentieren direkte Systeme Öl-in-Wasser- (o/w, Abbildung 5, A)) und inverse Systeme Wasser-in-Öl-Emulsionen (w/o, Abbildung 5, B)). Die Wahl des Tensids und des Mengenverhältnisses von wässriger und Öl-Phase zueinander bestimmen den Typ der entstehenden Emulsion.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung einer direkten (A) und einer inversen Miniemulsion (B)). Ultrahydrophob (z. B. Hexadecan) und Ultralipophob (z. B. sehr gut wasserlösliche Salze) sind osmotische Reagenzien, die in der kontinuierlichen Phase unlöslich sind und den Prozess der Ostwaldreifung verhindern.**

Um Miniemulsionssysteme zu erhalten, werden zwei nicht miteinander mischbare Phasen (disperse und kontinuierliche Phase) zuerst voremulgiert und anschließend hohen Scherkräften (z. B. Ultraschall) ausgesetzt, wodurch sich homogene und eng verteilte Nanotröpfchen bilden. Aufgrund eines osmotischen Reagenzes (Ultrahydrophob bzw. Ultralipophob), das in der Tröpfchenphase vorliegt, sowie der Verwendung eines geeigneten Tensids weisen diese Tröpfchen eine hohe Stabilität auf.<sup>79</sup> Das osmotische Reagenz ist in der kontinuierlichen Phase unlöslich und verhindert durch das Aufbauen eines osmotischen Drucks, der dem Laplacedruck innerhalb der Tröpfchen entgegenwirkt, das diffusionsgesteuerte Wachsen großer Tropfen auf Kosten von kleinen (Ostwaldreifung). Bei einer direkten Miniemulsion wird z. B. Hexadecan als osmotisches Reagenz, in diesem Fall

auch Ultrahydrophob (Löslichkeit in Wasser kleiner als  $10^{-7}$  mL/mL) genannt, eingesetzt.<sup>80</sup> Bei inversen Miniemulsionen kommen sehr gut wasserlösliche Salze als osmotische Reagenzien zum Tragen. Diese werden auch als Ultralipophob bezeichnet. Die Tröpfchengröße wird im Wesentlichen beeinflusst durch die Menge und die Art des Tensids sowie die Dauer der Einwirkung von hohen Scherkräften.<sup>81</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten Tenside sind in Abbildung 6 dargestellt. Das Tensid, das in der direkten Miniemulsion zur Synthese der Nanopartikel Anwendung fand, ist ein amphiphiles HPMA-basiertes Block-Copolymer (Abbildung 6, A)). Die Stabilisierung der Nanokapseln, welche mittels inverser Miniemulsion hergestellt wurden, erfolgte mit Hilfe der Tenside Polysorbat 80 (Tween® 80) sowie Span® 80 (Abbildung 6, B)).



**Abbildung 6: Strukturformeln der Tenside, die in der direkten (A)) und in der inversen Miniemulsion (B)) Anwendung fanden.**

Wie bereits erwähnt, können in Miniemulsion verschiedene Polymerisationstechniken angewendet werden, um so Nanopartikel zu generieren. Zum Beispiel können Polystyrol-Nanopartikel mit Hilfe radikalischer Polymerisation hergestellt werden. Dazu werden zunächst das Monomer, osmotisches Reagenz und der Initiator in der dispersen sowie das Tensid in der kontinuierlichen Phase vorgelegt und im Anschluss durch Verwendung hoher Scherkräfte homogenisiert, wobei eine direkte Miniemulsion entsteht. Anschließend erfolgt die Polymerisation innerhalb der dispergierten Monomertröpfchen, wobei Polymer-

Nanopartikel mit geringer Größenverteilung entstehen. Aufgrund der Stabilisierung der Miniemulsion durch das osmotische Reagenz kommt es während des Polymerisationsprozesses zu keiner Nettodiffusion zwischen den Monomertröpfchen. Da aus jedem Tröpfchen ein Partikel generiert wird, können diese Tröpfchen auch als Nanoreaktoren<sup>79</sup> angesehen werden.

Die Größe der entstehenden Nanopartikel entspricht idealerweise der der Nanotröpfchen. Mit Hilfe des Miniemulsionsprozesses, dessen Prinzip erstmals von Ugelstad *et al.*<sup>82</sup> vorgestellt wurde, können nanopartikuläre Systeme in einem Größenbereich von 50-500 nm hergestellt werden.<sup>81, 83</sup> Jedoch erweist sich die Polymerisation in den entstandenen Tröpfchen bei manchen Polymeren als äußerst komplex, so dass auf eine Kombination aus Miniemulsionsprozess und Lösungsmittelverdampfung zurückgegriffen wird. Dabei bestehen die dispergierten Tröpfchen typischerweise aus einem organischen, hydrophoben Lösungsmittel, in dem ein bereits synthetisiertes Polymer gelöst ist. Nach Verdampfen des Lösungsmittels erhält man eine Dispersion von Polymer-Nanopartikeln.<sup>79</sup> Auf die Zugabe eines zusätzlichen osmotischen Reagenzes kann verzichtet werden, da das Polymer selbst diese Rolle einnimmt. Diese Methode wurde vorwiegend für die Herstellung der Nanopartikel angewendet, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Der direkte Miniemulsionsprozess gestattet es, hydrophobe Moleküle in Nanopartikeln einzuschließen. Dies ist von Vorteil, um hydrophobe Wirkstoffe (z. B. Paclitaxel) wässrigen Medien zugänglich zu machen wie beispielsweise Blut, so dass Zellen hydrophobe Moleküle aufnehmen können.

Über das System der inversen Miniemulsion können dagegen hydrophile Moleküle wie etwa DNA oder Oligonukleotide, die beispielsweise sehr sensitiv bezüglich enzymatischer Abbauprozesse sind, in Zellen eingeschleust werden. Dabei werden die wässrigen Nanotröpfchen mit einer Polymerhülle verkapselt. Solche Nanokapseln werden beispielsweise mittels Nanofällung<sup>84-85</sup> oder Grenzflächenpolymerisation, welche anionisch,<sup>86</sup> radikalisch<sup>87</sup> oder als Polyaddition<sup>88</sup> sowie Polykondensation<sup>89</sup> ablaufen kann, hergestellt.<sup>79</sup> Die Kapseln, die für diese Arbeit synthetisiert wurden, sind mittels anionischer Grenzflächenpolymerisation in einer inversen Miniemulsion generiert worden, um so Oligonukleotide im wässrigen Medium zu verkapseln.

### 2.2.2 Nanohydrogelpartikel *via* Selbstorganisation

Klassische Hydrogele bestehen u. a. aus hydrophilen Polymeren, die durch kovalente oder nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander zu stabilen Netzwerken verbunden sind und sich durch die Eigenschaft auszeichnen, in wässrigem Medium zu quellen.<sup>90-91</sup> Mikrogele



bzw. Nanogele sind kolloidal stabile Hydrogele, deren Größe im Nanometer- bis Mikrometer-Bereich liegt und die sich, sofern ein biokompatibles Polymer verwendet wird, als Trägersysteme für Wirkstoffe in biomedizinischen Anwendungen einsetzen lassen.<sup>92-93</sup> Zusätzlich können Hydrogele die Fähigkeit mit sich bringen, auf Stimuli wie Temperatur oder pH<sup>94</sup>, Licht<sup>95</sup> oder auch Biomoleküle<sup>96-97</sup> zu reagieren. Zhu und Napper<sup>98</sup> verwendeten beispielsweise das Block-Copolymer Poly(*N*-isopropylmethacrylamid)-*b*-Poly(ethylenoxid) (P(NIPAm)-*b*-PEO), welches mit *N,N'*-methylbis(acrylamid) copolymerisiert und damit vernetzt wurde, um so stabile Mikrogelpartikel zu erhalten. Die Gruppe um K. Wooley nutzten die Eigenschaften eines amphiphilen Block-Copolymers, das aus Polystyrol und Poly(acrylsäure) gebildet wurde, um mittels Selbstorganisation (*engl.* self-assembly) Kern-Schale-Partikel zu erhalten, wobei die „Hülle“ der entstandenen Mizellen mit Hilfe von Aminen vernetzt wurde, woraus hydrogelähnliche Strukturen entstanden.<sup>99</sup>

In der Arbeitsgruppe Zentel wurde eine Möglichkeit zur Nanohydrogelsynthese entwickelt, bei der amphiphile Block-Copolymere als Präkursorpolymer verwendet werden. Diese lagern sich aufgrund der Selbstorganisation zu Mizellen bzw. Polymeraggregaten zusammen, wobei im polaren Milieu der hydrophobe Anteil den Kern und der hydrophile Anteil die „Hülle“ der Mizelle bildet. Um stabile Nanohydrogelpartikel (NHP) zu erhalten, können diese Mizellen im Kern vernetzt werden. Aus den hydrophoben Polymeraggregat-Kernen, welche Pentafluorphenylester enthalten, werden durch Vernetzung mit Spermin kationische Kerne, die z. B. Oligonukleotide elektrostatisch binden können.

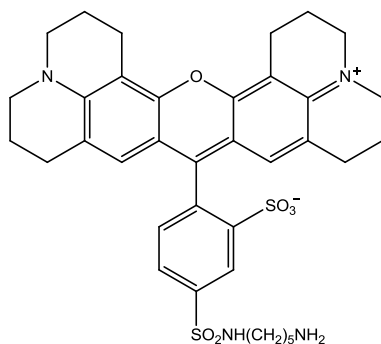
Wie bereits erwähnt, können Hydrogele auf externe Stimuli wie Temperatur oder pH ansprechen. Die verwendeten Nanohydrogelpartikel verhalten sich sensitiv hinsichtlich einer pH-Wert-Änderung. Na und Bae<sup>100</sup> nutzten Nanohydrogel-Partikel, die ebenfalls mittels Selbstorganisationsprozess dargestellt wurden, um die Freisetzung des Wirkstoffs Adriamycin® (Handelsname von Doxorubicin) zu untersuchen. Die Freisetzung sollte dabei durch eine pH-Wert-Absenkung ausgelöst werden, aufgrund derer die Partikel schrumpfen und der Wirkstoff aus dem Partikel freigesetzt wird. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanohydrogelpartikeln führt eine Änderung des pH-Wertes in den sauren Bereich zur Quellung, wodurch in Kombination mit anderen intrazellulären Prozessen eine Freigabe des Inhalts erreicht werden kann.

Nanohydrogele stellen also als hydrophile, physikalisch oder chemisch vernetzte Polymere<sup>101</sup> vielversprechende Trägersysteme für den Wirkstofftransport sowie –freisetzung (*engl.* drug delivery) dar,<sup>102-103</sup> da sie sich unter anderem durch eine hohe Ladekapazität an wasserlöslichen Komponenten und einer erheblichen Stabilität in physiologischem Milieu

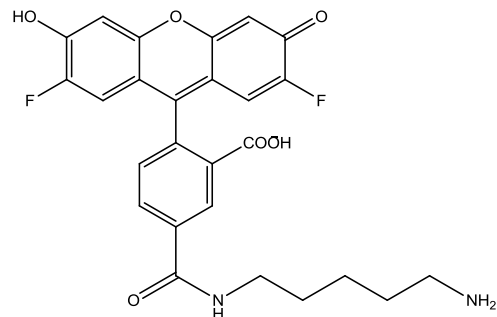
auszeichnen. Aufgrund der Tatsache, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten Polymere spontan in polaren, aprotischen Lösemitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Aggregaten zusammenlagern, können nach Vernetzung der hydrophoben, reaktiven Kerne durch Amine komplett hydrophile Nanohydrogelpartikel erhalten werden, die als Polykationen in der Lage sind, Polyanionen wie beispielsweise „small interfering RNA“ (siRNA) durch elektrostatische Wechselwirkung aufzunehmen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Hydrogelpartikel eine Möglichkeit bieten, sensitive Substanzen wie siRNA auf der einen Seite vor enzymatischen Angriffen zu schützen und zum anderen eine Aufnahme in Zellen zu gewährleisten.

### 2.3 Markierung nanopartikulärer Systeme mittels Fluoreszenzfarbstoffe

Jegliche nanopartikulären Systeme, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, wurden für eine Detektion am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) fluoreszenzmarkiert. Dabei wurden die Fluoreszenzmoleküle entweder durch hydrophobe Wechselwirkungen in den Partikeln eingebettet oder hauptsächlich kovalent an das nanopartikuläre System oder dessen Inhalt gebunden. Die Strukturformeln zweier wichtiger Fluorophore, die kovalent angebunden wurden, sind in Abbildung 7 dargestellt.



Texas Red Cadaverin

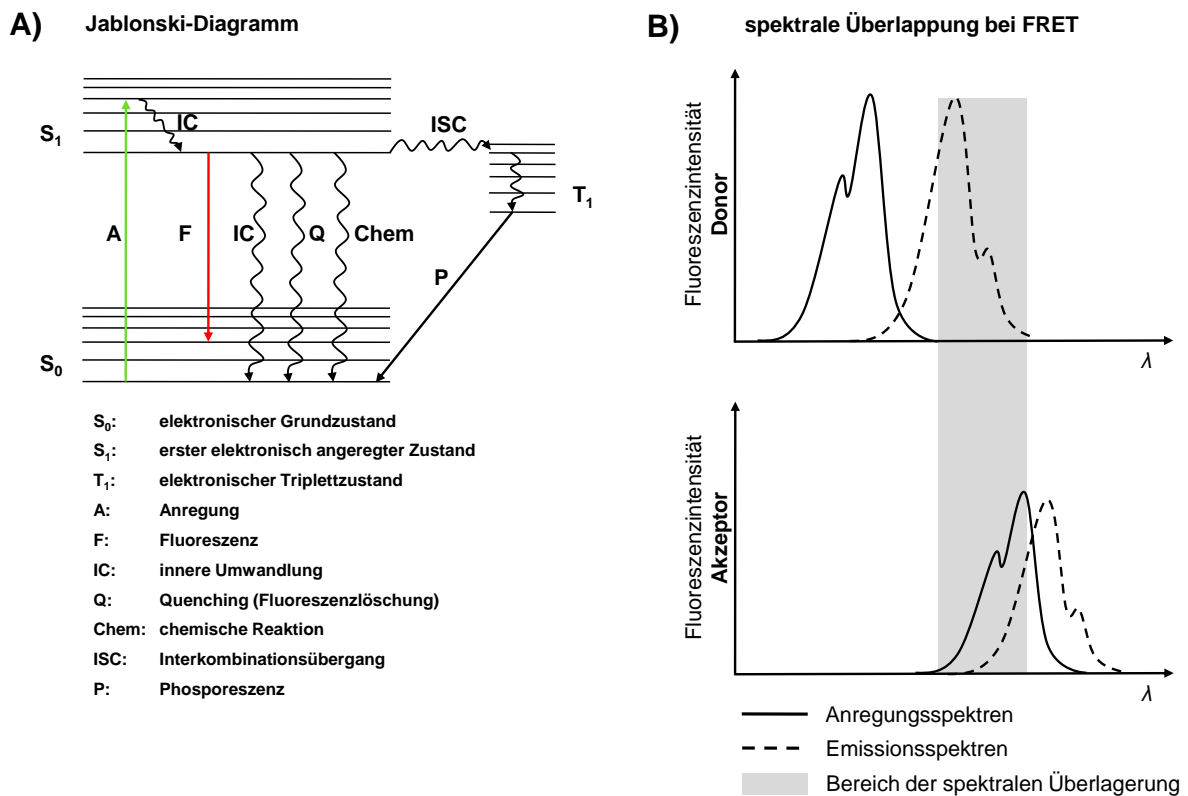


Oregon Green Cadaverin

**Abbildung 7: Strukturformeln zweier Fluoreszenzfarbstoffe, die durch kovalente Anbindung nanopartikuläre Systeme markierten.**

Wird ein Fluoreszenzmolekül, das sich im elektronischen Grundzustand befindet, durch Absorption von Licht in einen höheren Zustand angeregt, so können diverse Prozesse zur Relaxation zurück in den elektronischen Singulett-Grundzustand  $S_0$  erfolgen. Eine Übersicht der Relaxationsprozesse gibt das Jablonski-Diagramm (Abbildung 8, A)) wieder. Dazu

zählen unter anderem auch die Strahlung emittierenden Vorgänge der Photolumineszenz, nämlich Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Die Aussendung eines Photons bei Fluoreszenz erfolgt in einem Zeitraum von ca. 10 ns, was der Lebensdauer eines Fluorophors entspricht. Dabei bleibt der Elektronenspin bei der Rückkehr in den Grundzustand erhalten. Dem gegenüber steht die Phosphoreszenz, welche in einem deutlich längeren Zeitraum erfolgen kann und mit der eine Spinumkehr einhergeht. Aufgrund von Schwingungsrelaxationen, Stößen mit dem Lösungsmittel und anderen Prozessen verliert das Molekül einen Teil der Energie, die es durch Absorption aufgenommen hat, wodurch das Spektrum der Fluoreszenz zu höheren Wellenlängen verschoben ist (Rotverschiebung, Stokes-Shift). Ein weiteres Merkmal des Fluoreszenzspektrums ist die mehr oder weniger spiegelbildliche Darstellung des Anregungsspektrums.



**Abbildung 8:** A) Darstellung der möglichen Relaxationsprozesse eines Fluorophors nach Anregung in einem Energieterm-Schema (Jablonski-Diagramm). Modifiziert nach.<sup>104</sup> B) Schematische Darstellung der spektralen Überlappung von Donor- und Akzeptor-Molekül eines FRET-Paares.

Ein besonderer Effekt stellt die strahlungslose, auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen basierende Energieübertragung auf ein Akzeptormolekül dar, der sogenannte Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanzenergie-Transfer (FRET), dessen Theorie 1948 von Förster entwickelt wurde.<sup>105</sup> Dieser Transfer hängt stark vom Abstand zwischen Donor- und

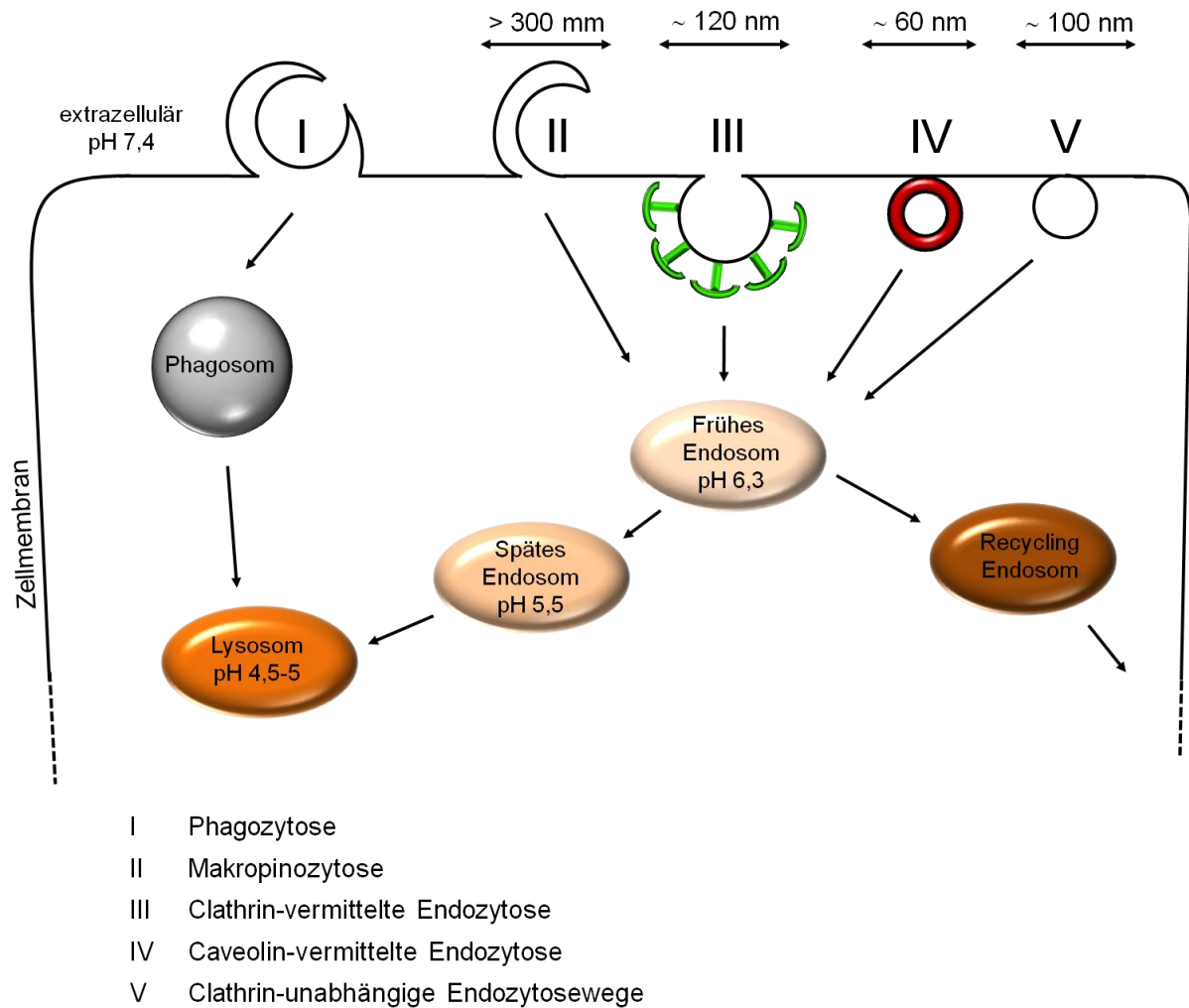
Akzeptormolekül ab, genauer gesagt nimmt der Energietransfer mit der sechsten Potenz des Abstands ab.<sup>104</sup> Dieser sogenannte Förster-Radius liegt im Nanometerbereich und beschreibt den Abstand, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt. Die Energie kann, je nach Wahl des Fluorophorenpaars bzw. FRET-Paares, über eine Entfernung von bis zu 10 nm effizient übertragen werden.<sup>106</sup>

Ein weiterer Punkt, der im Hinblick auf FRET angesprochen werden muss, ist die spektrale Überlappung von Donor und Akzeptor, welche in Abbildung 8, B) skizziert ist. Überlappt das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors, so kann Energie strahlungslos übertragen werden.

FRET wird unter anderem für die Analyse biologischer Prozesse eingesetzt wie etwa die Anwendung eines FRET-Paares in Biosensoren, um z. B. die Phosphorylierung bestimmter Sequenzen aufzuklären<sup>107</sup> oder die Aktivität zellulärer Kinasen zu testen.<sup>108</sup> In dieser Arbeit wurde mittels FRET qualitativ überprüft, ob die eingesetzten, verkapselten Oligonukleotide innerhalb der Zelle bzw. während des Transports dorthin abgebaut wurden. Dies konnte durch die Markierung der verwendeten Oligonukleotid-Sequenz durch das FRET-Paar der Cyanin-Farbstoffe Cy3/Cy5 realisiert werden. Dabei war das Fluorophor Cy3 am 3'-Ende der Sequenz und Cy5 am 5'-Ende angebunden. Auf Berechnungen der Übertragungseffizienz oder anderer Größen wurde verzichtet, da eine qualitative Überprüfung ausreichend für die Zielsetzung war. Die Voraussetzungen der spektralen Überlappung und der Einhaltung des Förster-Radius zwischen Donor (Cy3) und Akzeptor (Cy5) wurden durch die 20 Basenpaare große Oligonukleotid-Sequenz erfüllt.

### **2.4 Aufnahmemechanismen der Zelle**

Die Zellmembran, eine dynamische Struktur, auf welche im Besonderen in 2.6.3 eingegangen wird, ist nur durchlässig für kleine Moleküle. Genauer gesagt können nur kleine, ungeladene polare oder hydrophobe Moleküle wie Wasser, Kohlenstoffdioxid, Sauerstoff ungehindert ins Zytoplasma diffundieren. Ionen, Aminosäuren oder größere, polare, ungeladene Moleküle wie Glucose bedürfen spezieller Membrantransportproteine, welche als Kanäle oder Pumpen fungieren und so die Substanzen aktiv ins Zellinnere transportieren.<sup>109-110</sup> Makromoleküle werden dagegen mittels Endozytose, einer Form des aktiven Transports, unter Ausbildung von Transportvesikeln internalisiert.<sup>111-112</sup> Die Aufnahme nanopartikulärer Systeme basiert ebenfalls auf diesem Mechanismus, der in verschiedene Subtypen unterteilt werden kann, welche in Abbildung 9 vereinfacht dargestellt sind.



**Abbildung 9: Übersicht über eine Auswahl an Aufnahmemechanismen, die von Zellen genutzt werden.**  
 Modifiziert nach.<sup>113-117</sup>

Die Subtypen der Endozytose können dabei unterschieden werden in Makropinozytose, Clathrin-vermittelte sowie Clathrin-unabhängige Endozytose und Caveolin-vermittelte Endozytose. Ein Sonderfall stellt die Phagozytose dar, die nur von bestimmten Zellen wie etwa Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen ausgeübt wird, bei welcher Partikel, die größer als 750 nm sind, in sogenannten Phagosomen endozytiert werden.<sup>112</sup> Welcher Aufnahmeweg im Speziellen für verschiedene Nanopartikel in Frage kommt, hängt vorwiegend von deren Größe (siehe Abbildung 9) ab. Allerdings spielen auch Ladung,<sup>118</sup> Form,<sup>119</sup> Oberflächengestaltung (z. B. im Hinblick auf die funktionellen Gruppen) oder auch die Möglichkeit der Nanopartikel-Agglomeration oder -Aggregation eine Rolle.<sup>112</sup>

Aufgrund des Einflusses verschiedener Faktoren im Hinblick auf die favorisierte Art des Aufnahmeweges und der Tatsache, dass eine gewisse Größenverteilung der verwendeten

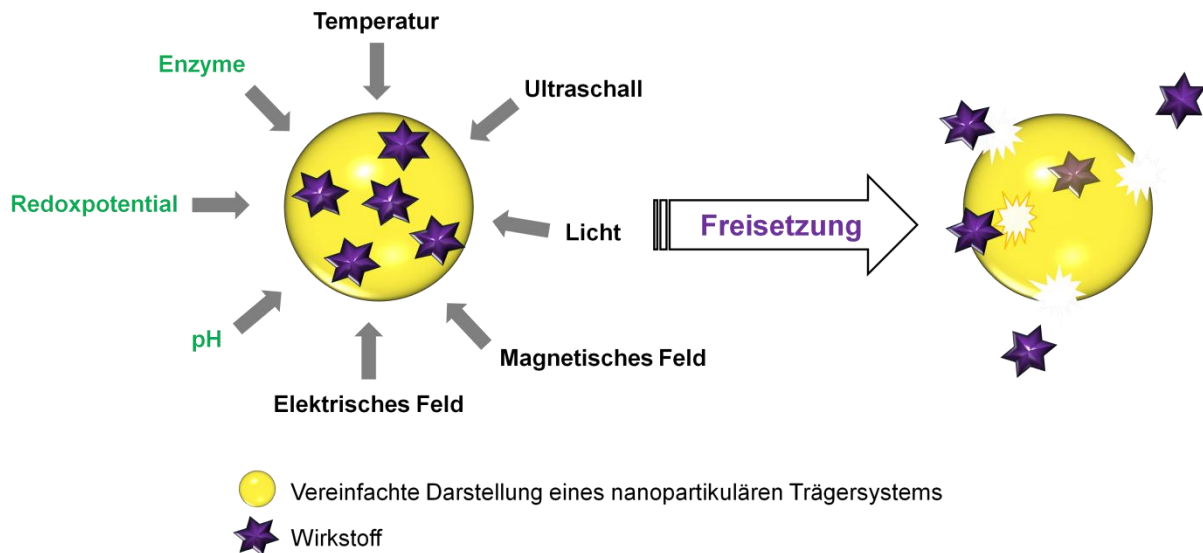
nanopartikulären Systeme vorlag, wird in dieser Arbeit nur der Überbegriff Endozytose verwendet, um die Internalisierung von Nanopartikeln zu beschreiben.

Eine besondere Form der Aufnahme stellt die Rezeptor-vermittelte Endozytose dar. Dabei internalisiert die Zelle Partikel, an deren Oberfläche bestimmte Moleküle gebunden sind, welche mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren können. Diese Form der Aufnahme kommt bei einem gezielten Wirkstofftransport zu bestimmten Zellen zum Tragen.<sup>15</sup>

Allen Aufnahmewegen ist jedoch gemein, dass die aufgenommenen Partikel in Endosomen bzw. alternativ in Phagosomen gelangen, welche letztendlich mit Lysosomen verschmelzen oder über Recycling-Endosomen zurück zur Zellmembran transportiert werden.<sup>9</sup> Innerhalb dieses Transportwegs ändert sich der pH-Wert je nach Zellkompartiment, was durchaus für eine Freisetzung von Wirkstoffen ausgenutzt werden kann. Diese Möglichkeit zur Freisetzung wird detaillierter im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

### **2.5 Freisetzung der Partikelbeladung/ des Kapselinhalts**

Außerhalb der Zelle liegt der Anspruch an ein Trägersystem für Wirkstoffe auf einer hohen Stabilität, um die eingeschlossenen, sensitiven Moleküle vor Einflüssen, die zum Abbau führen, zu schützen. Weiterhin sollten keine toxischen Effekte ausgelöst werden und das Trägersystem eine hohe Blutzirkulation aufweisen. Wird dieses Trägersystem jedoch von Zellen internalisiert, so soll auch der Wirkstoff (kontrolliert) freigesetzt werden. Im Folgenden wird eine Auswahl an Stimuli vorgestellt, die zu einer Freisetzung von Wirkstoffen aus nanopartikulären Systemen führen können. Zusammenfassend sind diese in Abbildung 10 dargestellt. Es sei jedoch erwähnt, dass der Fokus dieser Arbeit im Wesentlichen in der Detektion der Freisetzung verschiedener Partikel- bzw. Kapselinhalte lag und weniger in der Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung möglicher Einflussfaktoren, die eine Wirkstofffreisetzung aus einem nanopartikulären Trägersystem hervorrufen können. Biologische Faktoren sind grün dargestellt.**

Biologische Faktoren, die eine Freisetzung hervorrufen können, sind der pH-Wert, Enzyme und das Redoxpotential innerhalb der Zellen.<sup>120</sup> Ein leicht herabgesetzter pH-Wert in Endosomen und Lysosomen im Vergleich zum extrazellulären Milieu (Vergleich Abbildung 9) oder dem Zytoplasma (pH 7,4) kann ein Quellen des nanopartikulären Trägersystems (*engl.*: Nanocarrier) oder eine Zerstörung desselben durch den Abbau der Polymermatrix hervorrufen, wodurch der Wirkstoff effizient freigesetzt wird.<sup>120</sup> In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass Krebszellen ebenfalls einen leicht sauren pH-Wert im Bereich 6,5-7,2 aufweisen.<sup>121</sup> Die Freisetzung, die durch ein Quellen bzw. eine Verformung des Trägersystems hervorgerufen wird, basiert zum Beispiel auf der Protonierung von Aminen im sauren Umfeld, welche in einer pH-sensitiven Polymermatrix der Nanocarrier enthalten sind.<sup>122</sup> Die Freisetzung aufgrund des Abbaus eines pH-sensitiven Polymers ist bei Nanocarriern bekannt, deren Polymere abbaubare Hydrazone oder Acetale enthalten.<sup>123</sup>

Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-cysteinyl-glycin, GSH), welches u. a. im Zytosol der Zellen in deutlich höheren Konzentrationen (2-10 mM) als vergleichsweise im Blut oder der extrazellulären Matrix (2-20  $\mu$ M) vorkommt, kann als Reduktionsmittel ausgenutzt werden, um eine Freisetzung aufgrund des Redoxpotentials zu erreichen.<sup>124</sup> Tumorgewebe hat im Vergleich zu normalem Gewebe eine 4-fach erhöhte Glutathion-Konzentration.<sup>125</sup> Redox-sensitive Nanocarrier, deren Polymere über Disulfid-Brücken verlinkt sind, können daher mittels Glutathion gespalten werden und so den Wirkstoff intrazellulär freisetzen.<sup>126</sup>

Das Hauptaugenmerk lag in dieser Arbeit in der Freisetzung aufgrund enzymatischer Prozesse, wodurch das polymere Partikel- bzw. Kapselmateriale abgebaut wurde. Zum

Beispiel enthalten Lysosomen eine Vielfalt an Verdauungsenzymen wie etwa Proteasen.<sup>127</sup> Die Proteasen Cathepsin B und D, welche in soliden Tumoren hochreguliert sind,<sup>128</sup> können zum Beispiel die Proteinsequenz Gly-Phe-Leu-Gly (Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin) gut spalten.<sup>120</sup> Dies kann ausgenutzt werden, um Nanocarrier zu designen, die diese Proteinsequenz enthalten, um eine Tumor-spezifische Freisetzung von Wirkstoffen zu erzielen. Neben Proteasen können auch Lipasen oder Glukosidasen dazu führen, Wirkstoffe aus entsprechend gestalteten Nanocarriern freizusetzen. So ist zum Beispiel bekannt, dass die Lipase Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in sehr hohen Konzentrationen in der Umgebung von Tumoren vorkommt.<sup>129</sup> Das kann bei Nanocarriern ausgenutzt werden, die aufgrund eines Abbaus durch PLA<sub>2</sub> zytotoxische Verbindungen generieren oder Wirkstoffe entlassen, um so auf Tumore gezielt einzuwirken.<sup>13</sup> Ein Vertreter der Glukosidasen, welche Kohlenhydrate abbauen, stellt die  $\alpha$ -Amylase dar. Dieses Enzym tritt in einer 85-fach höheren Konzentration in der Umgebung eines Tumors auf, woraus sich die Möglichkeit ergibt, Zucker-basierte Nanocarrier zu entwickeln, welche Wirkstoffe selektiv in Tumorgewebe freisetzen.<sup>13</sup> Als letzter Vertreter der Hydrolasen sollen die Esterasen angesprochen werden, auf welche sich vorwiegend der Abbau der in dieser Arbeit verwendeten polymeren Nanocarrier stützt. Eine detaillierte Beschreibung des Abbaus wurde bereits in den Kapiteln 2.1.1 sowie 2.1.3 erwähnt.

Neben den diskutierten biologischen Einflussfaktoren, können auch Änderungen hinsichtlich der Temperatur eine Veränderung (z. B. Schrumpfen) eines polymeren Trägersystems hervorrufen, wodurch die Freisetzung eines Wirkstoffs möglich gemacht wird. Typischerweise werden dafür Polymere verwendet, deren Phasenübergang innerhalb biologisch relevanter Temperaturen (35-42 °C) liegt.<sup>130</sup> Solche thermoresponsiven Polymere weisen eine untere kritische Lösungstemperatur (*engl.*: lower critical solution temperature, LCST) auf, bei deren Überschreitung das Polymer phasensepariert und eine Freisetzung ermöglicht wird.<sup>130</sup> Ein bekanntes Beispiel eines thermoresponsiven Polymers ist Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), dessen LCST bei 33 °C liegt.<sup>131</sup> Es ist bekannt, dass die Temperatur innerhalb Tumoren oder entzündeten Bereichen höher als die normale Körpertemperatur ist, wodurch eine therapeutische Anwendung thermoresponsiver Systeme möglich wird.<sup>132</sup>

Auch die Einflussfaktoren Licht und elektrisches Feld stellen attraktive Möglichkeiten zur Wirkstofffreisetzung dar, da das Anlegen eines elektrischen Feldes oder die Einstrahlung von Licht sehr gut und einfach von außen anzuwenden bzw. zu kontrollieren ist.<sup>132</sup> Des Weiteren können auch Ultraschall<sup>133</sup> oder das Anlegen eines Magnetfeldes<sup>134</sup> die Freisetzung beeinflussen.



Generell kann man sagen, dass, ungeachtet der Einflussfaktoren, die Freisetzung aus einer Polymermatrix auf fünf Arten erfolgen kann.<sup>135</sup> Zum einen ist eine Desorption des Wirkstoffs (I), der an der Oberfläche des Trägersystems gebunden ist, möglich oder die Diffusion durch die Trägermatrix (II). Weitere Möglichkeiten bestehen in der Diffusion durch die polymere Hülle einer Nanokapsel (III), dem Abbau der Trägermatrix (IV) oder in einer Kombination aus Abbau und Diffusion (V). Die Freisetzungsrates hängt dabei u. a. von der Löslichkeit und der Bioabbaubarkeit der Trägermatrix sowie von der Größe und der Beladungskapazität des nanopartikulären Systems ab.<sup>135</sup> Größere polymere Nanopartikel weisen eine geringere schnelle, initiale Freisetzung (*engl.*: burst release) und dafür eine längere anhaltende Freisetzung auf als kleinere Partikel.<sup>77</sup> Zudem sei erwähnt, dass eine höhere Wirkstoffbeladung der Partikel eine schnellere, initiale Freisetzung bedingt.<sup>77</sup>

In der Literatur werden oftmals partikuläre Systeme beschrieben, die Potential als Wirkstofftransporter (*engl.*: drug carrier) haben. Dabei wird häufig die Aufnahme dieser Systeme in Zellen beschrieben, welche durch die Detektion der fluoreszenzmarkierten Partikel realisiert wird. Auf das Potential als „Drug Carrier“ und eine damit verbundene Freisetzung des Wirkstoffs wird nur hingewiesen.<sup>78</sup> Der Nachweis einer Freisetzung von Cargo ist aber zwingend erforderlich, wenn nanopartikuläre Systeme als Trägermaterialien eingesetzt werden. Dabei ist v. a. eine Freisetzung ins Zytoplasma von großer Wichtigkeit, da ein Abbau der Wirkstoffe durch lysosomale Enzyme vermieden werden soll.

Arbeiten, die eine Freisetzung nachwiesen, realisierten deren Detektion häufig über Zellviabilitätstests vor und nach Einwirkung bestimmter Parameter (z. B. Licht), die eine Wirkstofffreisetzung induzieren sollten.<sup>136</sup> Aber auch die Detektion der Wirkstofffreisetzung aufgrund von Fluoreszenz wird ausgenutzt. Wang *et al.* demonstrierten die Freisetzung, indem sie ein Wirkstoffmodell verwendeten, das erst fluoreszierte, nachdem es aus polymeren Trägerpartikeln freigesetzt wurde, da es durch intrazelluläre Esterasen in die fluoreszierende Form umgesetzt wurde.<sup>137</sup>

In den beschriebenen Fällen beschränkte man sich auf eine einfache Markierung der Wirkstofftransportsysteme, die entweder auf den Wirkstoff selbst oder das Trägermaterial angewendet wurde. Doch ist es interessant beides zu wissen: wird der Wirkstoff ins Zytoplasma freigesetzt und wo verbleibt das Trägermaterial. In der vorliegenden Arbeit wird zum einen die Freisetzung von Wirkstoffmodellen analysiert und zum anderen auf den Verbleib des polymeren Trägermaterials eingegangen. Dies wurde durch eine doppelte Fluoreszenzmarkierung von beidem, Wirkstoffmodell und Trägermaterial, realisiert.

## 2.6 Zellkompartimente und deren Markierung

Aufgrund der Detektion am CLSM ist es essentiell, Zellkompartimente fluoreszent zu markieren. Abbildung 11 zeigt diejenigen Kompartimente, die mit kommerziellen Farbstoffen oder Antikörpern angefärbt werden können. Innerhalb dieser Doktorarbeit wurden hauptsächlich Mitochondrien, Lysosomen und die Zellmembran (Plasmamembran) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im Folgenden wird nicht nur auf die speziellen Farbstoffe, sondern auch auf die Besonderheiten dieser Zellorganellen eingegangen.

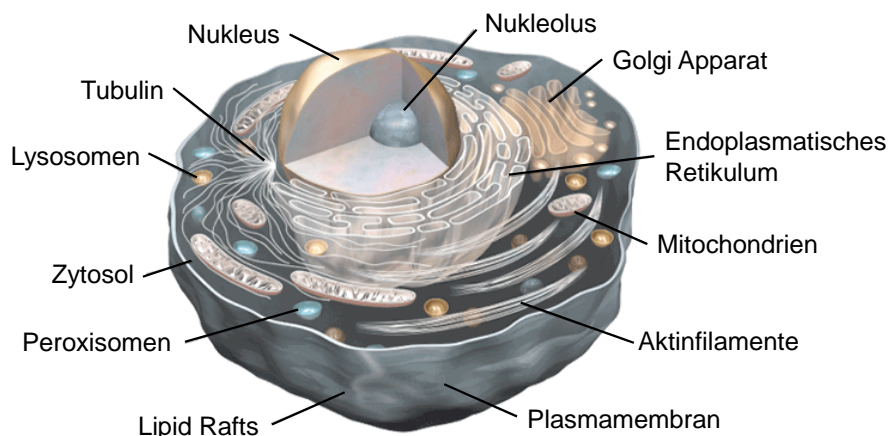
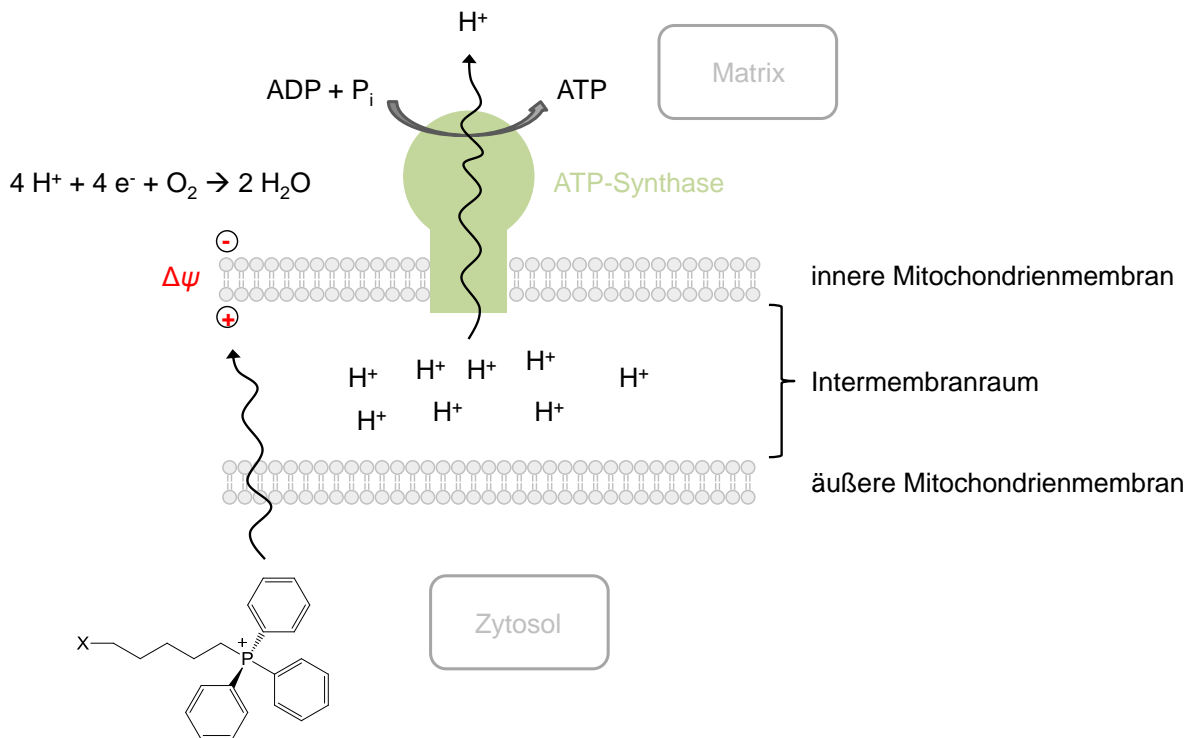


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aufbaus einer tierischen Zelle. Gezeigt sind alle Zellkompartimente, die mit speziellen Farbstoffen intrazellulär markiert werden können. Modifiziert nach.<sup>138</sup>

### 2.6.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind die Organellen, die das meiste Adenosintriphosphat (ATP) in eukaryotischen Zellen unter  $O_2$ -Verbrauch produzieren (oxidative Phosphorylierung) und sind außerdem an vielen anderen metabolischen Prozessen beteiligt wie etwa der Fettsäure-Oxidation, der Glukoneogenese oder dem Zitratzyklus.<sup>139</sup> Sie spielen auch eine wichtige Rolle innerhalb des Apoptosemechanismus, was als attraktive Möglichkeit zur Krebsbekämpfung für die Chemotherapie ausgenutzt werden kann.<sup>140</sup> Aus morphologischer Sicht haben Mitochondrien ein sehr vielseitiges Auftreten. Sie können als sphärische Partikel, Cluster oder Filamente und sogar als Netzwerke existieren, wobei die Netzwerke durch dynamische Prozesse wie Verschmelzen und Teilung (*engl.*: fusion and fission) oder der aktive Transport über Mikrotubuli und Aktinfilamente ausgebildet werden.<sup>141</sup> Mitochondrien sind von zwei Membranen umhüllt, wobei die innere Membran Einstülpungen aufweist, die Cristae genannt werden. An diesen Cristae findet die ATP-Synthese durch die ATP-Synthase statt, welche wiederum durch einen Protonengradienten angetrieben wird

(Abbildung 12).<sup>142</sup> Zwischen beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum. Die innere Mitochondrienmembran umschließt die Mitochondrienmatrix, in welcher mitochondriale DNA sowie mitochondriale Ribosomen enthalten sind. Die äußere Mitochondrienmembran ist für Ionen und kleine Moleküle bis 6 kDa<sup>14</sup> permeabel (allerdings nicht für Proteine), wohingegen die innere Membran nur mit Hilfe von speziellen Transportproteinen passiert werden kann.<sup>142</sup>



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Komponenten eines Mitochondriums, in welches aufgrund des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\psi$  lipophile Kationen eindringen können. Modifiziert nach.**<sup>142-143</sup>

Das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran  $\Delta\psi$ , welches durch die Enzyme der Atmungskette aufgebaut wird, weist einen Wert von 180-200 mV auf<sup>144</sup> und ist somit deutlich höher als das der Plasmamembran, welches zwischen 30 und 60 mV liegt.<sup>14</sup> Diese Tatsache in Kombination mit der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran kann ausgenutzt werden, um lipophile Kationen in die Mitochondrien zu leiten. Um Mitochondrien intrazellulär fluoreszent zu markieren, wurde der Farbstoff MitoTracker® Green FM verwendet, der vor allem für Lebendzellfärbungen geeignet ist und ebenfalls als lipophiles Kation angesehen werden kann. Dieses Molekül soll laut Hersteller auch bei einer Änderung des Membranpotentials die Mitochondrien weiterhin gut anfärben.<sup>145</sup> Anhand von Versuchen mit lebenden Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass das Membranpotential einen wesentlichen Einfluss auf die Färbung hatte.

Lipophile Kationen wie Triphenylphosphonium-Verbindungen akkumulieren selektiv in Mitochondrien aufgrund des hohen mitochondrialen Membranpotentials, was zuerst in der Gruppe von Skulachev gezeigt wurde.<sup>146</sup> Triphenylphosphonium-basierte Verbindungen werden heutzutage typischerweise verwendet, um das mitochondriale Membranpotential in lebenden Zellen zu messen oder um Mitochondrien in der Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren.<sup>14</sup> Weiterhin ist bekannt, dass viele Krebszellen ein höheres mitochondriales Membranpotential aufweisen als normale Zellen, wodurch die Idee aufkam, lipophile Kationen auch für das selektive Zerstören von Krebszellen einzusetzen, beispielsweise indem diese speziellen Kationen mit toxischen Komponenten modifiziert wurden.<sup>147</sup>

Unter Ausnutzung sogenannter Entkoppler kann das mitochondriale Membranpotential herabgesetzt werden, da diese eine Depolarisation der Membran hervorrufen, welche bereits nach ca. 5 s auftritt.<sup>148</sup> Die Depolarisation wird durch ein Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran hervorgerufen, welches durch den Entkoppler verursacht wird, was zum Abbau des Protonengradienten führt.<sup>149</sup> Ein solcher Entkoppler, Dinitrophenol (DNP), wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um das mitochondriale Membranpotential herabzusetzen und um so zu zeigen, ob dies Auswirkungen auf das Anlagern bestimmter Substanzen (Cy5-markierte Oligonukleotide und MitoTracker®) an bzw. in Mitochondrien hat.

### 2.6.2 Lysosomen

Lysosomen sind bekannt als intrazelluläre Kompartimente, die in einem Größenbereich von 0,1-1  $\mu\text{m}$  liegen, von einer einfachen, Cholesterin-armen<sup>150</sup> Membran umgeben sind und in welchen der enzymatische Abbau zellulärer Bestandteile erfolgt.<sup>142</sup> In der ca. 7-10 nm dicken Membran konnten bereits 25 lysosomale Membranproteine identifiziert werden, wobei u. a. das Lysosomen-assoziierte Membranprotein (LAMP-1, -2) am häufigsten vorkommt.<sup>151</sup> Innerhalb der Lysosomen herrscht ein saures Milieu mit einem pH-Wert von 4,5-5,0, welcher das pH-Optimum der ca. 60<sup>150</sup> enthaltenen Hydrolasen bildet. Zu diesen sauren Hydrolasen zählen neben den bereits in 2.5 erwähnten Proteasen, Lipasen und Glucosidasen auch Nukleasen, Phosphatasen, Sulfatasen sowie Lysozym, welche mittels hydrolytischer Spaltung Substanzen abbauen.<sup>142</sup> Das azide Innere der Lysosomen wird auch für deren Markierung ausgenutzt. So wurde z. B. in dieser Arbeit der Farbstoff LysoTracker® Red verwendet, welcher sich aus einer schwachen Base mit angebundenem Fluorophor zusammensetzt, Zellmembranen frei passieren kann und in sauren Organellen akkumuliert.<sup>152</sup> Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Lysosomen in Krebszellen meist nicht mehr perinukleär (nahe des Zellkerns), sondern in den peripheren Bereichen lokalisiert sind.<sup>153</sup>

Die lysosomale Membran ist gegenüber Abbauprodukten wie Aminosäuren, Fettsäuren, Nukleosiden oder Monosacchariden permeabel, so dass diese zum Wiederaufbau zelleigener Substanzen genutzt werden können.<sup>142</sup> In neutraler Umgebung, wie sie im Zytosol vorliegt (pH 7,4), weisen die lysosomalen Verdauungsenzyme eine weitaus geringere Wirksamkeit auf,<sup>153</sup> was durchaus als Schutzmechanismus der Zelle gegen Selbstverdau angesehen werden kann.<sup>110</sup> Die lysosomalen Enzyme werden durch einen Mannose-6-Phosphatrest gekennzeichnet. Fehlt dieser „lysosomale Marker“, kann es zu sogenannten „lysosomalen Speicherkrankheiten“ kommen wie dem Niemann-Pick-Syndrom (Anreicherung von Biomembran-Resten in Lysosomen aufgrund des Fehlens von Sphingomyelinase).<sup>142</sup>

Neben dem Verdau von zelleigenen Bestandteilen (Autophagie) können Lysosomen auch Stoffe, die von außen kommen, verdauen (Heterophagie) und dienen somit auch zur Inaktivierung von Bakterien.<sup>142</sup> Extrazelluläres Material gelangt dabei hauptsächlich über Endozytose-Wege in die Lysosomen.<sup>150</sup> Auch endozytierte Nanopartikel gelangen auf diesem Weg in Lysosomen. In der vorliegenden Arbeit soll u. a. aufgezeigt werden, wie schnell eine solche Akkumulation in Lysosomen erfolgen kann.

Lysosomen sind nicht nur am Abbau diverser Substanzen beteiligt, sondern sind u. a. auch bei der Reparatur der Zellmembran involviert, indem sie mit der Zellmembran an deren beschädigter Stelle fusionieren.<sup>150</sup> Ein wichtiger Punkt ist auch die Kontrolle der Lysosomen-Biogenese durch den Transkriptionsfaktor EB (TFEB), welcher das Level der lysosomalen Enzyme, die Lysosomenanzahl und u. a. auch das Fusionieren der Lysosomen mit der Plasmamembran reguliert.<sup>150</sup>

### **2.6.3 Zellmembran**

Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, welche eine Dicke von ca. 5 nm aufweist, und dient nicht nur als Permeabilitätsbarriere, sondern erfüllt u. a. auch die Funktionen für den Im- und Export von Molekülen (z. B. durch Endozytose) oder den Empfang von Informationen.<sup>109</sup> Aufgrund ihres Aufbaus aus Phospholipiden können Fluoreszenzfarbstoffe, welche ebenfalls lipophiler Natur sind, die Membran anfärben. Diese Farbstoffe werden jedoch schnell internalisiert. Besser sind dagegen amphiphile Farbstoffe geeignet, z. B. die verwendeten CellMask™-Farbstoffe, da diese sozusagen einen hydrophilen „Anker“ aufweisen, um dadurch länger in der Membran verweilen zu können. Dadurch wird das Zeitfenster für mikroskopische Beobachtungen verbreitert.<sup>154</sup>

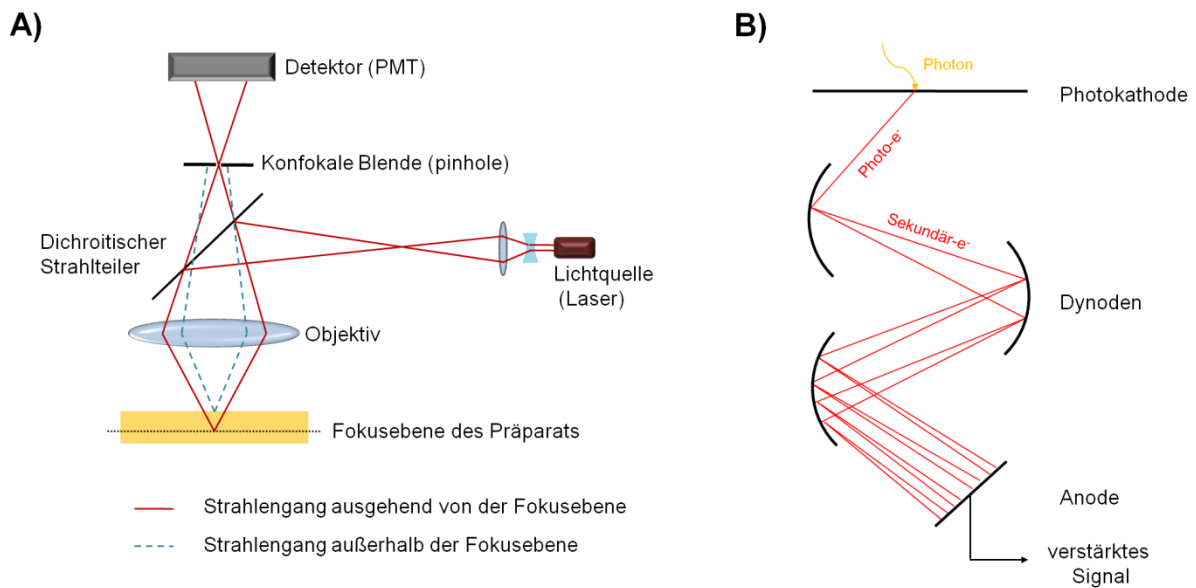
### 3 Methoden

In diesem Kapitel werden alle Methoden vorgestellt, die auch selbst angewendet wurden. Methoden, auf welchen Ergebnisse beruhen, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit implementiert sind, allerdings von Projektpartnern erzielt wurden, werden nicht beschrieben.

#### 3.1 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Das Funktionsprinzip, welches die konfokale Mikroskopie auszeichnet, basiert auf dem Einsatz einer konfokalen Blende (*engl.*: pinhole), durch welche nur das Fluoreszenzlicht der Fokusebene bei Betrachtung eines Präparats zum Detektor gelangt und so optische Schnitte möglich macht. Diese einfache, jedoch wirkungsvolle Idee geht auf Marvin Minsky zurück, welcher sich diese 1957 patentieren ließ.<sup>105, 155</sup> Der Strahlengang innerhalb eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (*engl.*: confocal laser scanning microscope, CLSM) ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Laserlicht wird punktförmig auf das Präparat geleitet, wobei dieses mittels beweglicher Scannerspiegel innerhalb einer Fokusebene Linie für Linie abgerastert wird. Um nur das emittierte Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene zu detektieren, wird der Vorteil einer konfokalen Blende genutzt, die vor dem Detektor angebracht wird. Die konfokale Blende ermöglicht es, dass nur Strahlen aus der Fokusebene den Detektor erreichen und Strahlen, die außerhalb des Fokus liegen, von der Blende geblockt werden. Die Bezeichnung „konfokal“ bezieht sich darauf, dass der Detektionsfokus und der Fokus der entsprechenden Präparateebene genau übereinander liegen. Üblicherweise werden als Detektoren Sekundärelektronenvervielfacher (*engl.*: photomultiplier tube, PMT) eingesetzt, deren Funktionsweise in Abbildung 13, B) skizziert ist. Beim Auftreffen eines Photons wird aus der Photokathode aufgrund des Photoeffekts ein Elektron freigesetzt, welches durch den Einsatz mehrerer Dynoden (typischerweise mehr als 3) vervielfacht wird.<sup>104</sup> Diese Sekundärelektronen treffen schließlich auf eine Anode, von welcher das verstärkte Signal, das zu Beginn das aufgetroffene Photon verursacht hat, ausgelesen werden kann.

Die Auflösungsgrenze eines konfokalen Mikroskops in xy-Richtung (lateral) liegt typischerweise bei ca. 200 nm, die Auflösung, die in z-Richtung (axial) erreicht werden kann bei ca. 500 nm. Die Auflösung, d. h. die Fähigkeit eines Objektivs zwei benachbarte Punkte hinreichend als getrennte Objekte darzustellen und nicht zu einem einzigen großen Punkt verschmelzen zu lassen,<sup>156</sup> wird im Wesentlichen durch das Objektiv selbst und den Durchmesser der konfokalen Blende beeinflusst.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Strahlengangs innerhalb eines CLSMs (A)), modifiziert nach.<sup>157</sup> Aufgrund der konfokalen Blende (pinhole) erreicht nur das Licht der Fokusebene den Detektor. In B) wird schematisch das Funktionsprinzip eines PMTs dargestellt, der u. a. als Detektor im CLSM eingesetzt wird. B) modifiziert nach.<sup>104</sup>

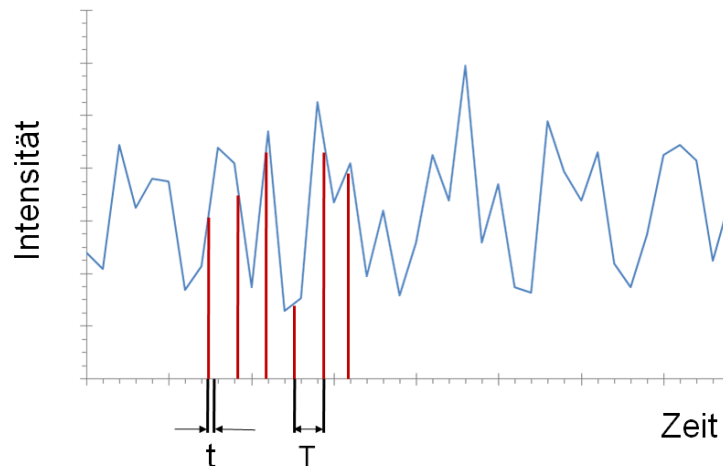
Das Auflösungsvermögen des Objektivs ist durch seine Numerische Apertur (NA) festgelegt, welche definiert ist durch den Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Deckglas und Objektivlinse und den halben Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs. Unter Berücksichtigung der Wellenlänge des Lichts  $\lambda$  kann die Auflösungsgrenze  $d$  nach E. Abbe wie folgt beschrieben werden.<sup>104</sup>

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad \text{mit} \quad NA = n \cdot \sin\alpha \quad (\text{Gl.1})$$

Um die bestmögliche Auflösung zu erhalten, wird auf die Verwendung von Immersionsobjektiven zurückgegriffen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein Öl-Objektiv verwendet, dessen NA bei 1,4 liegt.

Um bei optimaler Auflösung keinen Informationsverlust durch das Abrastern (*engl.*: scannen) zu erhalten, muss beachtet werden, dass genügend Bildpunkte aufgenommen werden und die Digitalisierung der vom Detektor registrierten Objektinformation korrekt erfolgt. Um einen Informationsverlust zu vermeiden, sollte das Nyquist-Theorem eingehalten werden. Dies besagt, dass die digitale Auflösung die optische Auflösung um mindestens das Doppelte (optimalerweise Faktor 2,3) übersteigen soll.<sup>158</sup> Abbildung 14 zeigt einen möglichen Einfluss auf die Bilddarstellung, wenn das Theorem nicht eingehalten wird. Ein Analog/Digital-(A/D)-Wandler transformiert das elektrische Signal des Detektors durch periodisches Abtasten in

eine äquidistante Abfolge von Messwerten (= Pixel). Erfolgt diese Punktabtastung zu langsam, so kommt es zur Unterabtastung (*engl.*: undersampling), die in Abbildung 14 schematisch dargestellt ist. Ein „Undersampling“ besteht dann, wenn die Dauer  $T$  der Abtastung zwischen zwei Punkten erheblich größer ist als die Dauer der Messwertaufnahme  $t$ , wodurch Datenverlust entsteht und Details eines Bildes verloren gehen.



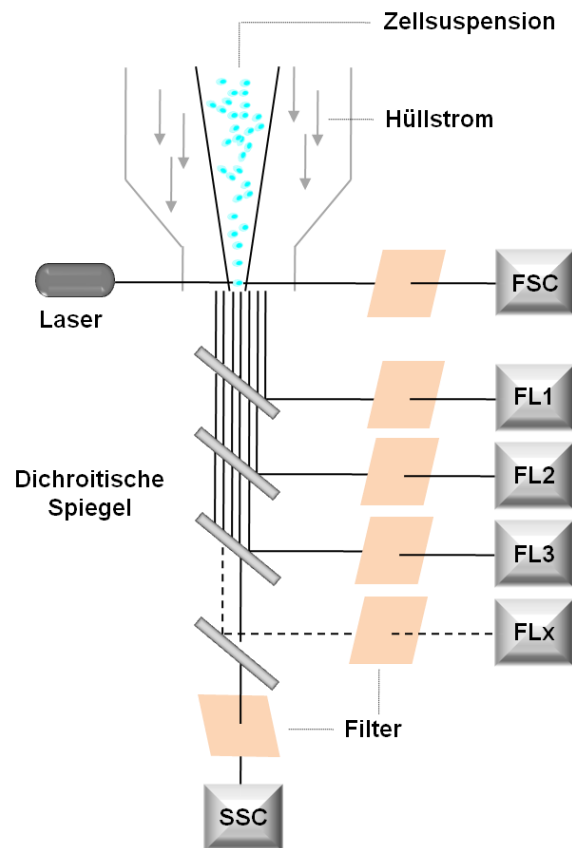
**Abbildung 14: Schematische Darstellung des „Undersamplings“, was zu Datenverlust führt. Die Dauer der Messwertaufnahme ist durch  $t$  gekennzeichnet, die Dauer der Punktabtastung durch den A/D-Wandler wird durch  $T$  wiedergegeben. Modifiziert nach.<sup>157</sup>**

## 3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode der relativen, quantitativen Vermessung der Fluoreszenz bei gleichzeitiger Charakterisierung der Zellen dar. Neben Zellgröße und Granularität wird auch die Fluoreszenzintensität pro Einzelzelle bestimmt, wenn die Zellen beispielsweise mittels fluoreszierender Antikörper oder, wie im Falle der vorliegenden Arbeit, durch aufgenommene, fluoreszierende Partikel/ Kapseln markiert waren. Das grundsätzliche Funktionsprinzip liegt neben der optischen Analyse im hydrodynamischen Transport. Dabei wird eine Zellsuspension langsam angesaugt und von einem Hüllstrom derart verdünnt und fokussiert, dass es möglich ist, Einzelzellen nacheinander als Sequenz zu vermessen (Abbildung 15). Am Messpunkt kreuzt ein Laserstrahl im rechten Winkel den Probenstrom, wodurch Fluorophore angeregt werden und Einzelzellen das Laserlicht streuen. Das gestreute Licht wird von zwei unterschiedlichen Detektoren erfasst. Dabei gibt das im rechten Winkel zum Laserstrahl detektierte, seitwärts gestreute Licht (*engl.* side scatter, SSC) Aufschluss über die Granularität der Zellen, die vor allem von intrazellulären Kompartimenten abhängt. Streulicht, welches in Richtung des Laserstrahls detektiert wird (*engl.* forward scatter, FSC), lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen zu. Ebenfalls im



rechten Winkel zum Laserstrahl werden Fluoreszenzsignale mit verschiedenen PMTs (FL1, FL2, ...) detektiert. Dichroitische Spiegel und Filter sorgen dafür, dass die entsprechenden Signale zu SSC und Fluoreszenz-Detektor geleitet werden.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. Modifiziert nach.<sup>159-160</sup>

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die hauptsächlich Anwendung in der klinischen Routinediagnostik findet, wird zum Beispiel der DNA-Gehalt von Tumorzellen oder die Anzahl bestimmter Zellen, die über Antikörper identifiziert werden (z.B. CD4+ T-Zellen), bestimmt.<sup>161</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um Aussagen zur quantitativen Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln bzw. deren Inhalt zu treffen. Jede Zelle wird bei der Analyse als separater Messpunkt erfasst und in einer Punktwolkendarstellung (*engl.*: dot plot) abgebildet. Darin können die Signale einzelnen Populationen (z. B. lebende oder tote Zellen, Zelltrümmer) zugeordnet werden. Die Daten der einzelnen Populationen können anschließend genauer analysiert werden.

### 3.3 Mikrotiterplattenleser

Der verwendete Plattenleser von Tecan bietet die Möglichkeit, auf sehr flexible Art und Weise äußerst schnell Fluoreszenz- sowie Absorptionsmessungen durchzuführen. Dieses multifunktionale, auf Monochromatoren basierende Gerät ist auf hohen Durchsatz ausgelegt, wodurch Messungen in 6-Well-Platten bis hin zu 1536-Well-Platten möglich sind.<sup>162</sup> Standardmäßig wurden für die durchgeführten Versuche 96-Well-Platten verwendet. Neben der Quantifizierung von Fluoreszenz- oder Absorptionsintensitäten können auch Anregungsspektren sowie Emissions- und Absorptionsspektren der verwendeten Farbstoffe aufgenommen werden. Monochromatoren können bestimmte Wellenlängen eines Spektrums separieren. Der Bestandteil eines Monochromators, der dies ermöglicht, wird als dispersives Element bezeichnet und kann ein Prisma oder ein optisches Gitter sein. Der verwendete Plattenleser nutzt optische Gitter, welche bei Bestrahlung mit weißem Licht nur eine spezifische Wellenlänge durch den Austrittsspalt austreten lassen. Monochromatoren werden sowohl für die Anregung als auch für die Emission verwendet. Als Lichtquelle wird eine Xenon-Blitzlampe ausgenutzt, deren Vorteil es ist, mit nur einer Lampe hohe Intensitäten von Wellenlängen im UV- bis hin zum nahen IR-Bereich erzielen zu können. Auch bei dieser Methode kommen wieder PMTs als Detektoren zum Einsatz. Das Gerät wurde im Wesentlichen für Absorptionsmessungen im Rahmen der Toxizitätstests sowie für Fluoreszenzmessung hinsichtlich der FRET-Eigenschaften bestimmter Oligonukleotide verwendet.

### 3.4 Datenauswertung mit Volocity®

Die Auswertung von CLSM-Aufnahmen mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Volocity® 6.1.2 (PerkinElmer) wurde durchgeführt, um quantitative Analysen der Bilder zu ermöglichen und so optische Eindrücke quantifizieren zu können. Dabei wurden Fluoreszenzbilder, die sich aus mehreren Fluoreszenzkanälen zusammensetzten, Pixel für Pixel hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fluorophore sowie deren Überlagerung ausgewertet.

Das Hauptaugenmerk lag auf der Analyse der Kolo-kalisation zweier Fluorophore, die auf unterschiedlichen Wegen in die Zellen gebracht wurden. Genauer gesagt wurden Partikel respektive Kapseln mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In einem anschließenden Prozess wurden intrazelluläre Kompartimente wie beispielsweise Mitochondrien oder Lysosomen mit einem zweiten Fluorophor angefärbt, der das zweite Fluoreszenzsignal lieferte. Nach Inkubation der Zellen mit diesen nanopartikulären Systemen und anschließender Markierung entsprechender Zellkompartimente sollte überprüft werden, ob beide Fluorophore an der gleichen räumlichen Position intrazellulär vorlagen, d. h.

kolokalisierten. Dadurch konnte ermittelt werden, ob sich beispielsweise Partikel tatsächlich in Lysosomen befanden. Werden die Fluoreszenzsignale der beiden Fluorophore „rot“ und „grün“ dargestellt, so sind gelbe Regionen ein erster Hinweis auf Kolokalisation. Nur eine statistische Analyse erlaubt jedoch eine präzise Aussage über das Ausmaß der Kolokalisation.<sup>163</sup>

Eine Möglichkeit, den Grad der Überlappung bzw. der Kolokalisation zweier Fluoreszenzsignale in einem Bild zu ermitteln, ist die Berechnung des „Pearson’s Correlation Coefficient“ (PCC), welches weithin als Standardmethode gilt. Die Stärke einer linearen Beziehung zwischen zwei Fluoreszenzintensitäten aus der Überlagerung zweier Bilder wird statistisch ermittelt.<sup>164</sup> Dabei werden Werte von -1 (perfekte inverse Kolokalisation bzw. Antikolokalisation) bis 1 (perfekte positive Kolokalisation) erhalten, wobei man die negativen Werte nur sehr schwer interpretieren kann, wenn der Grad an Überlappung quantifiziert werden soll. Negative Werte werden zum Beispiel erreicht, wenn ein Pixel des einen Fluoreszenzkanals sehr hell ist (hoher Grauwert, hohe Fluoreszenzintensität) und im anderen Kanal an gleicher Stelle schwach ist (niedriger Grauwert, niedrige Fluoreszenzintensität).<sup>165</sup> Weiterhin sind auch Werte im mittleren Bereich (-0,5 bis 0,5) nur schwierig zu interpretieren.<sup>163, 165</sup> Laut Dunn *et al.*<sup>166</sup> ist PCC unabhängig von Hintergrundsignalen, doch lässt sich dieser Koeffizient nur bei Proben verwenden, bei denen ein linearer Zusammenhang zwischen den verschiedenen Pixelintensitäten zu erwarten ist. Beispielsweise würde eine Antigen-Antikörper-Beziehung die Auswertung der Kolokalisation mit Hilfe des PCC erlauben, denn dort, wo viel Antigen vorkommt, würde man auch viel Antikörper antreffen. Bei der Kolokalisation von Partikeln und Zellkompartimenten ist kein derartiger Zusammenhang zu erwarten. Die Intensität der angefärbten Komponenten sollte unabhängig von der Anlagerung der Partikel bzw. des Partikelinhalts sein. Daher wurde in dieser Arbeit die Kolokalisation vorwiegend mit anderen Koeffizienten beschrieben, wie es nachfolgend erläutert wird.

Eine andere Herangehensweise ist die Berechnung des Überlappungskoeffizienten, welcher Werte von 0 bis 1 annehmen kann. Ein Vorteil dieses Koeffizienten ist, dass Unterschiede in den Signalintensitäten beider Komponenten (Farbkomponenten bzw. Fluorophore), die kolokalisieren sollen, nicht ins Gewicht fallen. Unterschiede können zum Beispiel durch Bleicheffekte während der Bildaufnahme oder Verwendung unterschiedlicher Detektoren (verschiedene PMTs) auftreten. Allerdings bringt diese Methode auch einen Nachteil mit sich, welcher darin besteht, dass die Berechnung nicht aussagekräftig ist aufgrund des starken Einflusses des Verhältnisses, das sich aus der Anzahl an Objekten beider Komponenten ergibt. Es können daher nur verwendbare Informationen erhalten werden,

wenn sich die Anzahl der Objekte beider Fluoreszenzkanäle gleicht.<sup>167</sup> Dies ist meistens jedoch nicht der Fall bei biologischen Proben.

Deshalb wurden für die Berechnung zwei verschiedene Kolokalisations-Koeffizienten herangezogen, die nicht von den Intensitäten der Fluoreszenzsignale abhängig sind. Diese „Manders‘ Coefficients“ M1 und M2 können auch dann noch eindeutig bestimmt werden, wenn sich die Signalanteile der beiden Komponenten stark unterscheiden.<sup>167</sup> Costes *et al.* haben die Relevanz von M1 und M2 hinsichtlich biologischer Studien diskutiert.<sup>164-165</sup> Bolte und Cordelières<sup>163</sup> empfehlen auch die Verwendung der „Manders‘ Coefficients“, insbesondere wenn ein Vergleich verschiedener Datensätze vorgenommen werden soll, welche unter den gleichen Bedingungen entstanden sind.

Die Koeffizienten sind in Gleichung 2 und 3 wie folgt definiert:<sup>167</sup>

$$M1 = \frac{\sum_i R_{i, \text{coloc}}}{\sum_i R_i} \quad (\text{Gl.2})$$

$$M2 = \frac{\sum_i G_{i, \text{coloc}}}{\sum_i G_i} \quad (\text{Gl.3})$$

$R_i$  und  $G_i$  stellen jeweils Fluoreszenzintensitäten der Pixel des ersten Fluorophors (R, „rot“) und des zweiten Fluorophors (G, „grün“) eines Zweifarbenbildes dar. Dabei ist  $R_{i, \text{coloc}} = R_i$ , wenn  $G_i > 0$  und  $R_{i, \text{coloc}} = 0$ , wenn  $G_i = 0$  sowie  $G_{i, \text{coloc}} = G_i$ , wenn  $R_i > 0$  und  $G_{i, \text{coloc}} = 0$ , wenn  $R_i = 0$ .

Die Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 drücken also den Anteil der kolokalisierenden bzw. überlappenden Objekte innerhalb jeder Komponente eines zweifarbiges Bildes aus.<sup>167</sup> Um diesen Sachverhalt besser zu veranschaulichen, wurde schematisch die Ermittlung von M1 und M2 in Abbildung 16 dargestellt.

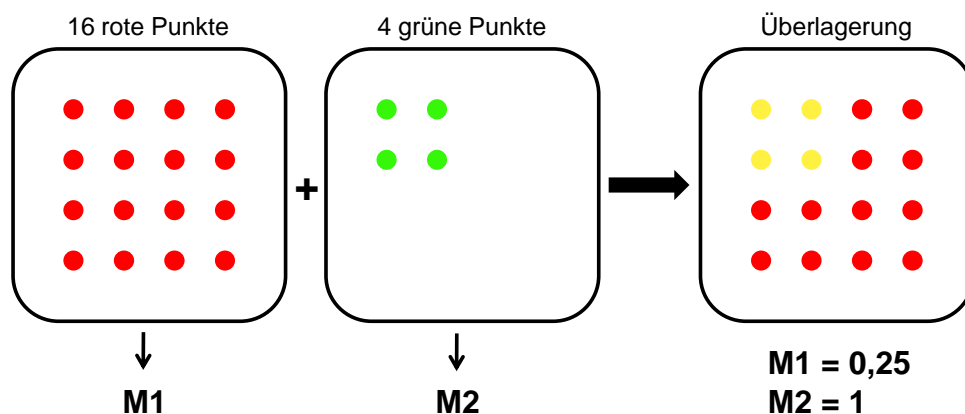


Abbildung 16: Schematische Darstellung zweier Fluorophore, die hinsichtlich Kolokalisation analysiert werden. Zur Veranschaulichung der Kolokalisation dienen die Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2.

Die Anzahl der roten Signale ist 4-mal höher als die der grünen Signale. Bei Überlagerung des roten Kanals mit dem grünen erkennt man deutlich, dass alle grünen Punkte kolokalisieren (gelb dargestellt). Dabei wird der Einfachheit halber angenommen, dass die grünen Punkte die gleiche räumliche Position aufweisen wie entsprechende rote Punkte. Für den grünen Kanal ergibt sich damit ein Kolokalisationskoeffizient  $M2 = 1$ . Da aber nicht alle roten Punkte (Signale) mit einem entsprechenden grünen Signal übereinstimmen, ergibt sich hierfür ein Kolokalisationskoeffizient von  $M1 = 0,25$ . Das heißt, nur ein Viertel der roten Signale kolokalisiert mit den grünen.

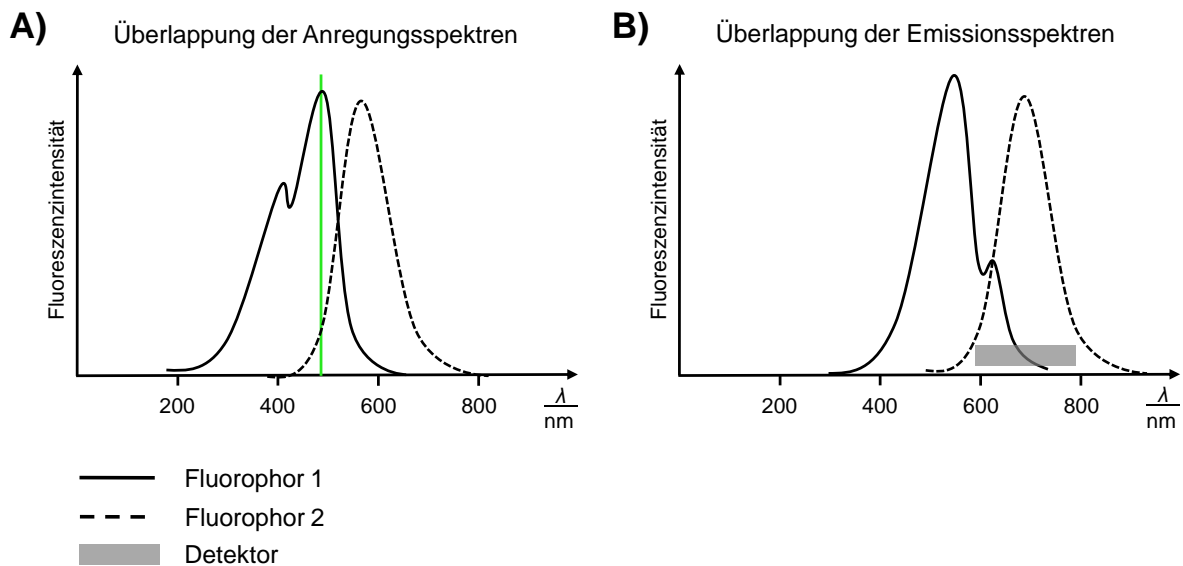
Die Auswertesoftware Volocity® berechnet automatisch  $M1$  und  $M2$  nach definierten Algorithmen, die im Wesentlichen aus Gleichung 2 und 3 abgeleitet sind. Dabei können sowohl 3D-Aufnahmen (z-Stapel, die aus mehreren optischen Schnitten bestehen) als auch 2D-Aufnahmen (1 optischer Schnitt) analysiert werden. Die Manders-Koeffizienten  $M1$  und  $M2$  können Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei bei 0 keine Kolokalisation und bei 1 vollständige Kolokalisation vorliegt.<sup>168</sup>

Ungeachtet der Vorteile, die die Auswertung der Manders-Koeffizienten mit sich bringt, sind doch einige Voraussetzungen zu beachten, um eine Auswertung erfolgreich durchzuführen. Diese Voraussetzungen bzw. Anforderungen beziehen sich auf generelle Einstellungen am Mikroskop, die Bildaufnahme, die Auswahl entsprechender Fluorophore und nicht zuletzt die Bildanalyse selbst. Störfaktoren, die die Fluoreszenzsignale beeinflussen, sind z. B. das Auftreten von Hintergrundfluoreszenz, Rauschen oder Dunkelstrom des PMTs (Strom, der auch ohne einfallende Strahlung fließt), was aber durch entsprechende Einstellungen am CLSM weitgehend eliminiert werden konnte.

Eine weitere Voraussetzung, um präzise Kolokalisationsstudien durchführen zu können, ist eine sehr gute Auflösung der Bilder, was durch die Bildaufnahme an einem konfokalen Mikroskop mit geeigneten Objektiven gewährleistet wurde. Dabei ist auch darauf zu achten, dass jeder Fluorophor die gleiche Punktspreizfunktion (*engl.* point spread function, PSF) aufweist. Dies ist bei gleichbleibender Einstellung des „pinholes“ mit 1 Airy-Einheit (AE), was dem Durchmesser des ersten Airy-Scheibchens bzw. der Halbwertsbreite (*engl.* full width half maximum, FWHM) der PSF in xy-Richtung entspricht, gegeben. Die FWHM entspricht in etwa der Auflösung des Mikroskops in lateraler Ausrichtung. An dieser Stelle sei erwähnt, dass das Airy-Scheibchen das zentrale Beugungsscheibchen darstellt, welches durch Interferenz beim Durchstrahlen durch eine Lochblende entsteht und einen physikalisch nicht mehr zu verkleinernden, durch Beugung begrenzten Lichtfleck darstellt.<sup>169</sup>

Bei Kolokalisationsstudien zweier Fluorophore ist das Vermeiden von sogenanntem „Durchbluten“ (*engl.*: bleed-through) und „Crosstalk“ ungemein wichtig. Unter „Crosstalk“

versteht man das ungewollte Erscheinen des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors, weil dessen Anregungsspektrum mit dem des eigentlich zu detektierenden Fluorophors überlappt und dadurch gleichzeitig angeregt wird. „Durchbluten“ bezieht sich auf die ungewollte Detektion eines Fluorophors, dessen Emissionsspektrum mit dem eigentlich zu detektierenden Fluorophor überlappt. Zum besseren Verständnis sind beide Faktoren in Abbildung 17 schematisch dargestellt.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Phänomene „Crosstalk“ (A), der auf die Überlappung der Anregungsspektren zweier Fluorophore zurückzuführen ist, sowie „Durchbluten“ (B), was durch überlappende Emissionsspektren hervorgerufen wird.**

Jedoch können diese Fehlerquellen weitgehend reduziert werden, indem bei der Bildaufnahme verschiedener Fluoreszenzen ein sequentieller Scanvorgang gewählt wird und Fluorophore verwendet werden, deren Anregungs- sowie Emissionsspektren weit genug voneinander entfernt liegen.

Bei der Berechnung der Kollisionskoeffizienten M1 und M2 ist darauf zu achten, einen Schwellenwert (*engl.*: threshold) für die Fluoreszenzsignale festzulegen,<sup>167</sup> um zum Beispiel Signale des Hintergrunds nicht in die Berechnungen mit einfließen zu lassen, die sonst zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Obwohl Hintergrundsignale durch entsprechende Einstellungen am CLSM reduziert wurden, können gerade bei Kinetikstudien, in welchen immer die gleichen Einstellungen verwendet werden, trotzdem ungewollte Signale auftreten. Jedoch ist das Setzen eines „Thresholds“ subjektiv. Es bleibt dabei immer eine Unsicherheit, ob der festgelegte Bereich für alle Bilder einer Kinetik passend ist. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, muss der „Threshold“ für alle analysierten Bilder gleich gesetzt

werden. Das Vermeiden übersättigter Pixel kann ebenfalls nicht immer garantiert werden, da gerade bei Kinetikversuchen, die über mehrere Tage durchgeführt werden, Abweichungen innerhalb der Fluoreszenzintensitäten angefarbter Organellen unumgänglich sind. Laut Bolte und Cordelières<sup>163</sup> können diese übersättigten Pixel nicht gut quantifiziert werden aufgrund des Fehlens des intensivsten bzw. höchsten Grauwertes. Dies sollte allerdings bei der Ermittlung der Manders-Koeffizienten nicht allzu stark ins Gewicht fallen, da diese, wie bereits erwähnt, unabhängig von Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden können. Weitere Fehlerquellen stellen zum Beispiel auch das schnelle Ausbleichen mancher Fluorophore oder die Autofluoreszenz der Zellen dar. Das heißt, einmal vorgenommene Einstellungen hinsichtlich Hintergrund, Laserintensität oder Detektorverstärkung können bei einer Kinetikstudie insbesondere bei den ersten und letzten Zeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Diese Abweichungen lassen sich allerdings nicht vermeiden, wenn man eine gewisse Konstanz in den Parametereinstellungen gewährleisten will, um somit eine Vergleichbarkeit der berechneten Ergebnisse zu erreichen. Einschränkungen hinsichtlich der Apertur der konfokalen Blende, die aus technischen Gründen nicht für jeden Fluorophor optimal eingestellt werden kann, sowie chromatische Aberrationen könnten eine exakte quantitative Auswertung beeinflussen bzw. verfälschen.

Ungeeignet zur quantitativen Bestimmung des Kollokalisationsgrades ist die Verwendung von Scatterplots (ähnlich der Punktwolkendarstellung aus Analysen mittels Durchflusszytometrie), in welchen die Intensitäten zweier Farben gegeneinander aufgetragen werden. Sie helfen lediglich bei der Ermittlung des Vorhandenseins verschiedener Populationen innerhalb eines Kompartiments.<sup>166</sup> Deswegen wurde auf die Darstellung von Scatterplots in dieser Arbeit verzichtet.

## 4 Material und Durchführung

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Zelllinien

##### HeLa

Diese Zelllinie wurde 1951 aus dem Gebärmutterhalskrebs von **Henrietta Lacks** etabliert, einer Afroamerikanerin, die mit 31 Jahren ihrer Krankheit erlag. Die Anfangsbuchstaben ihres Namens dienen der Bezeichnung der Zelllinie. HeLa-Zellen sind epitheloide Zellen, die in Monolagen wachsen, eine hohe Proliferationsrate aufweisen und kontinuierlich kultiviert werden.<sup>170</sup> Aufgrund ihrer einfachen Handhabung wird diese immortalisierte Zelllinie für viele biomedizinische Forschungsarbeiten verwendet.<sup>171</sup>

##### MCF-7

In den 1970ern wurde die MCF7-Krebszelllinie aus dem Pleuraerguss (abnorme Flüssigkeitsansammlung zwischen Brustkorb und Lunge) einer 69 Jahre alten kaukasischen Frau etabliert. MCF-7 gehören dem Zelltyp des Adenokarzinoms (bösartiger Tumor hervorgehend aus Drüsengewebe) des Brustkrebs an und wachsen ebenfalls in Monolagen wie auch andere epithelartige Zellen. Im Vergleich zu HeLa-Zellen wachsen diese in Clustern und verdoppeln sich innerhalb 50 h.<sup>172</sup> Das Institut „Michigan Cancer Foundation – 7“ etablierte die Zelllinie und ist zugleich für deren Namensgebung verantwortlich.<sup>173</sup>

##### MSC

Um die auf Krebszellen basierenden Versuche mit „gesunden“ Zellen zu vergleichen, wurden mesenchymale Stammzellen (engl. mesenchymal stem cells; MSC) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine multipotente, aus einer Primärkultur gewonnene Zelllinie, die das Vermögen zur Differenzierung in Osteoblasten (Knochenzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Adipozyten (Fettzellen) aufweist und ebenfalls in Monolagen wächst.<sup>174</sup> Die verwendeten MSCs wurden aus Knochenmark isoliert, das von einem gesunden Spender zur Verfügung gestellt wurde. Gewinnung und Kultivierung der MSCs wurden durch das zuständige Ethikkomitee im Entnahmezentrum (Universität Ulm) genehmigt.



## 4.1.2 Nanokapseln und –partikel

### Nanokapseln

Tabelle 1: Nanokapseln, synthetisiert von Dr. Grit Baier.

Bezeichnung	Kürzel	Polymer der Kapselhülle	Fracht	Markierung der Kapselhülle	$\zeta^a$ in mV	$d^b$ in nm/ rel. SD <sup>c</sup> in %
GB-ST-004	<b>NK1</b>	PBCA	Cy5-Oligos	-	-20	280/ 22
GB-ST-011	<b>NK2</b>	PBCA	Cy3/Cy5-Oligos	-	-19	255/ 20
GB-ST-013	<b>NK3</b>	PBCA/PPCA	Cy5-Oligos	TAMRA	-19	260/ 22

<sup>a)</sup> Zeta-Potential, bestimmt durch ZetaSizer. <sup>b)</sup> Hydrodynamischer Durchmesser, bestimmt *via* DLS (dynamische Lichtstreuung, Nicomp). <sup>c)</sup> Relative Standardabweichung.

### Nanopartikel

Tabelle 2: Nanopartikel, synthetisiert von Annette Kelsch.

Bezeichnung	Kürzel	Kernmaterial	Markierung des Kerns	Markierung von P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) <sup>a)</sup>	Synthesemethode	$d^b$ in nm/ rel. SD <sup>c</sup> in %
AK2-17	<b>NP1</b>	PS	nicht markiert	nicht markiert	MP <sup>d)</sup>	280/ 19
AK2-36	<b>NP2</b>	PDLLA	PMI (eingebettet)	nicht markiert	SE <sup>e)</sup>	300/ 23
AK2-49	<b>NP3</b>	PS	PMI (eingebettet)	nicht markiert	MP	110/ 12
AK2-65	<b>NP4</b>	PS	nicht markiert	Oregon Green	SE	300/ 33
AK2-66	<b>NP5</b>	PDLLA	nicht markiert	nicht markiert	SE	122/ 34
AK2-67	<b>NP6</b>	PS	nicht markiert	nicht markiert	SE	137/ 35
AK2-68	<b>NP7</b>	PDLLA	nicht markiert	Oregon Green	SE	350/ 23
AK2-100	<b>NP8</b>	PDLLA	PMI (eingebettet)	Texas Red	SE	250/ 33
AK2-108	<b>NP9</b>	PS	Bodipy (kovalent)	Texas Red	SE	270/ 39
AK2-159	<b>NP10</b>	PS	Bodipy (kovalent)	Texas Red	SE	250/ 28

<sup>a)</sup> Die Markierung des Block-Copolymers erfolgte am HPMA-Block durch kovalente Anbindung des Farbstoffs. Die Molare Masse  $M_n$  des Block-Copolymers betrug in allen Fällen 10.000 g/mol, wobei die Zusammensetzung der Blöcke ein Verhältnis von 90:10 (HPMA:LMA) aufwies, bei **NP10** betrug das Verhältnis 80:20 (HPMA:LMA) in Bezug auf die Wiederholungseinheiten. <sup>b)</sup> Hydrodynamischer Durchmesser, bestimmt *via* DLS (dynamische Lichtstreuung, Nicomp). <sup>c)</sup> Relative Standardabweichung. <sup>d)</sup> Miniemulsionspolymerisation. <sup>e)</sup> Kombination aus Miniemulsionsprozess und Lösungsmittelverdampfung (*engl.*: solvent evaporation).

## 4 Material und Durchführung

**Tabelle 3: Farbstoffe, die zur Markierung der Partikelkerne und des Block-Copolymers P(HPMA)-*b*-P(LMA) aus Tabelle 2 verwendet wurden.**

Farbstoff	Struktur	Markierung von	$\lambda(\text{ex, max})^{\text{a}}$ in nm	$\lambda(\text{em, max})^{\text{b}}$ in nm
PMI		Partikelkern	488	525
Bodipy		Partikelkern	504	527
Texas Red cadaverin		Block-Copolymer	586	605
Oregon Green cadaverin		Block-Copolymer	490	514

<sup>a)</sup> Anregungswellenlänge der Farbstoffe, <sup>b)</sup> Emissionswellenlänge der Farbstoffe

Tabelle 4: Nanohydrogelpartikel, synthetisiert von Lutz Nuhn.

Bezeichnung	Kürzel	Zusammen- setzung	$M_n^a)$ in g/mol	PDI <sup>a)</sup>	Beladung	Markierung	$d^b)$ in nm	$\zeta^c)$ in mV
LN201	NHP1	P(PFPMA)- <i>b</i> - P(MEO <sub>3</sub> MA)	25.100	1,23	z.T. siRNA bzw. Cy5- Oligos	Oregon Green	103	+34,9
LN439	NHP2	P(MEO <sub>3</sub> MA)- <i>b</i> - P(PFPMA)	14.200	1,24	-	Oregon Green	37	+44,4

<sup>a)</sup> Molare Masse  $M_n$  und Polydispersitätsindex PDI der Block-Copolymere vor Verlinkung mit Aminen, bestimmt via GPC (Gel-Permeations-Chromatographie). <sup>b)</sup> Hydrodynamischer Durchmesser nach Aminvernetzung, bestimmt via DLS (dynamische Lichtstreuung, Zetasizer Nano ZS, Malvern). <sup>c)</sup> Zeta-Potential, bestimmt durch ZetaSizer ZS

### 4.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotide, die als Fracht für verschiedene nanopartikuläre Systeme dienen.

Bezeichnung	Sequenz <sup>a)</sup>	Hersteller	$\lambda(\text{ex,max})^b)$ in nm	$\lambda(\text{em,max})^c)$ in nm
Cy5-Oligo	Cy5-5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'	Thermo Fisher Scientific (Ulm)	649	670
Cy3-Oligo	Cy3-5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'	Thermo Fisher Scientific (Ulm)	550	570
Cy3/Cy5-Oligo	Cy5-5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'-Cy3	Thermo Fisher Scientific (Ulm)	550/ 649	570/ 670
Alexa555-Oligo*	Alexa555-5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'	Invitrogen	555	565
Oligo-Cy5	5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'-Cy5	Thermo Fisher Scientific (Ulm)	649	670
Oligo-Cy3	5'-CCACTCCTTTCCAGAAAAC-3'-Cy3	Thermo Fisher Scientific (Ulm)	550	570

<sup>a)</sup> die Sequenz aller Oligos ist immer die gleiche und besteht aus 20 Nukleobasen. <sup>b)</sup> Maximum der Anregung. <sup>c)</sup> Maximum der Emission. \*) Dieses Oligo wurde mit Alexa Fluor® 555 markiert.

### 4.1.4 Geräte

Absaugpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience
Analysewaage XS205 Dual Range	Mettler-Toledo
Brutschrank	Heraeus Instruments
CLSM Leica SP5 II mit CW-STED (Software: LAS AF 2.6.0.7266, Auswertesoftware: LAS AF lite)	Leica

CyFlow ML (Software: FloMax 3.0, Auswertesoftware: FCSExpress V4)	Partec
Flow c-[MaxProj] <sup>3</sup> -130	Berner
Flow S@vamate 1.2	Bioair
Inkubator C200	Labotect
Invertiertes Mikroskop CKX41	Olympus
Pipetten	Eppendorf
Plate Reader Infinite M1000 (Software: i-control™ 1.10)	Tecan
Stickstoff Zelltank LS6000	Taylor-Wharton
Vortex Mixer Reax Control	Heidolph
Wasserbad	Memmert
Zählkammer Neubauer	Hirschmann EM Techcolor
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

### 4.1.5 Verbrauchsmaterialien

μ-dish 35mm, low, ibiTreat, tissue culture treated	IBIDI
BottleTop-Filter (0,2 μm)	Whatman
Falcon Flasks (15, 50 mL)	Becton Dickinson
Messröhrchen (FACS-Röhrchen)	Sarstedt
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one
Sterile Pipettenspitzen	Biozym und Starlab
Zellkulturflaschen Tissue culture Cellstar (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one
Zellkulturplatte (96-Well)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten Cellstar (6-Well)	Greiner Bio-one

**4.1.6 Reagenzien, Farbstoffe und Antikörper (AK)**

anti-Guinea-PIG-Alexa Fluor® 633 (Sekundär-AK)	Invitrogen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
CellMask™ Membranfarbstoffe	Invitrogen
CellTiter 96® A <sub>Queous</sub> One Solution Cell Ciprofloxacin	Fluka
DMEM (ohne Phenolrot)	Invitrogen
DPBS	Invitrogen
FCS	Invitrogen
Formaldehyd (4%ig aus Paraformaldehyd, PFA)	Sigma-Aldrich
GlutaMAX	Invitrogen
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
LysoTracker® Red (Lysosomenfärbung)	Invitrogen
MitoTracker® Green FM (Mitochondrienfärbung)	Invitrogen
Natriumdodecylsulfat ( <i>engl.</i> : sodium dodecyl sulfate, SDS)	Merck
Proliferation Assay (MTS-Assay)	Promega
Saponin	Sigma-Aldrich
Streptomycin/ Penicillin	Invitrogen
TIP47/PP17 Guinea pig polyclonal (Primär-AK)	Progen
Trypan-Blau	Sigma
Trypsin	Invitrogen

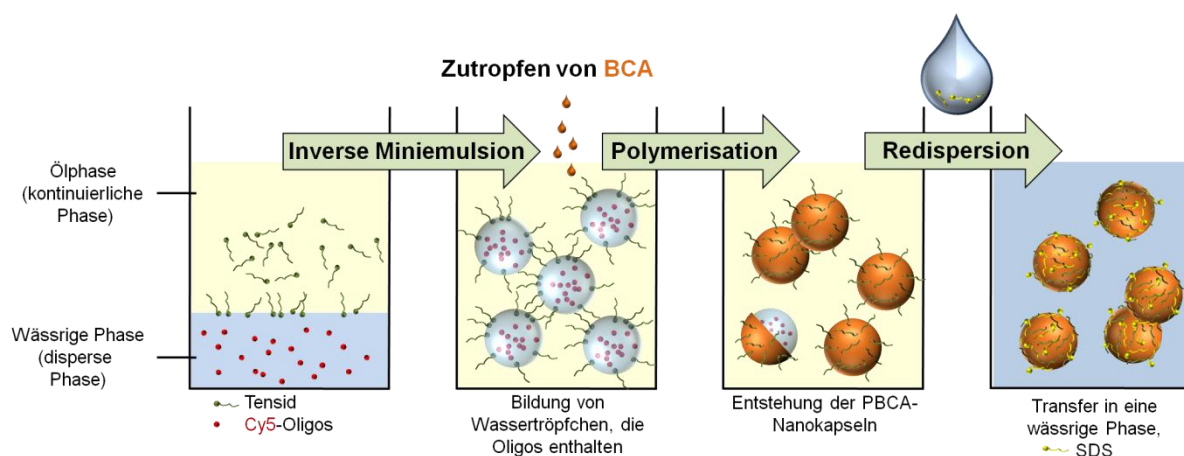
## 4.2 Durchführung

### 4.2.1 Synthese und Herstellungsprozesse der nanopartikulären Systeme

Alle verwendeten nanopartikulären Systeme wurden von Projektpartnern synthetisiert. Deswegen wird im Folgenden nur das prinzipielle Konzept der Präparation erläutert und auf den grundsätzlichen Aufbau der Nanokapseln und –partikel eingegangen. Außerdem wird kurz die Synthese der wichtigsten Polymere erklärt.

#### 4.2.1.1 Nanokapseln

Zur Herstellung der PBCA-Nanokapseln, die von Dr. Grit Baier synthetisiert wurden, ist die Methode der inversen Miniemulsion angewandt worden, die im Detail in Baier *et al.*<sup>30</sup> erläutert und in Abbildung 18 schematisch dargestellt wird. Generell wurden, wie bereits beschrieben, im Miniemulsionsprozess zwei Phasen (die kontinuierliche und die disperse), die nicht miteinander mischbar waren, durch mechanisches Rühren voremulgiert und diese Emulsion anschließend unter hohen Scherkräften, die durch Ultraschall (z .B. Ultraschallstab) erzeugt wurden, in eine Miniemulsion umgesetzt (homogenisiert). Dabei bestand die disperse Phase aus einem wässrigen Puffersystem, in welchem die Cy5-markierten Oligonukleotide gelöst waren. Die kontinuierliche Phase setzte sich aus dem Mineralöl Miglyol und den darin gelösten Tensiden Tween® 80 sowie Span® 80 (Vergleich 2.2.1) zusammen. Nach erfolgter Homogenisierung lagen dispergierte Wassertröpfchen, die die Oligonukleotide enthielten, vor, welche durch die an der Grenzfläche lokalisierten Tenside stabilisiert wurden.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Herstellung von PBCA-Nanokapseln, welche nach erfolgter inverser Miniemulsion durch anionische Polymerisation von BCA (*n*-Butylcyanacrylat) an der Wasser/Öl-Grenzfläche entstanden.

Durch Zutropfen des Monomers *n*-Butylcyanacrylat (BCA) erfolgte an der Grenzfläche von Wasser zu Öl eine anionische Polymerisation, die durch  $\text{OH}^-$  initialisiert wurde, wodurch die Kapselhülle aus Poly(*n*-butylcyanacrylat) gebildet wurde (Abbildung 19). Die PBCA-Nanokapseln wurden anschließend durch Redispersieren in einer 0,1%igen SDS-Lösung in eine wässrige Phase überführt und konnten nach erfolgter Dialyse (MWCO: 14 kDa) für biologische Versuche verwendet werden.

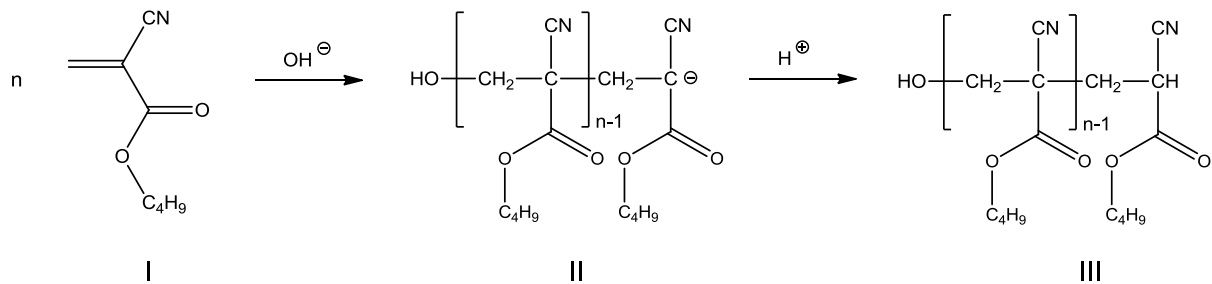


Abbildung 19: Reaktionsschema zur Darstellung von PBCA (III) aus *n*-Butylcyanacrylat (I), welches  $\text{OH}^-$ -initialisiert anionisch polymerisiert wurde (II).

#### 4.2.1.2 Nanopartikel

Neben der Herstellung der Partikel mit Hilfe des direkten Miniemulsionsprozesses wurde vor allem die Methode der Kombination aus Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfung für die Darstellung der PDLLA-sowie PS-Partikel genutzt. Letztere ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Partikel wurden von Annette Kelsch synthetisiert.

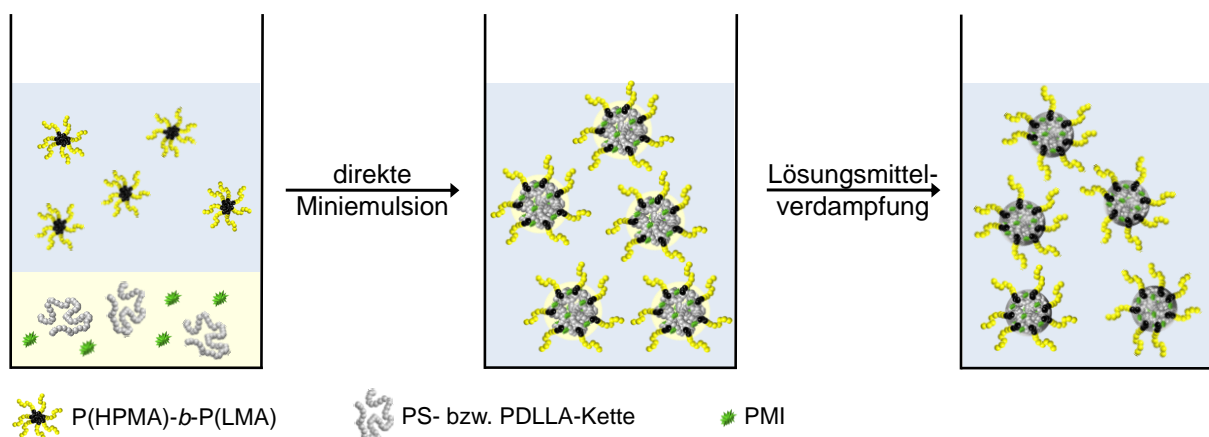
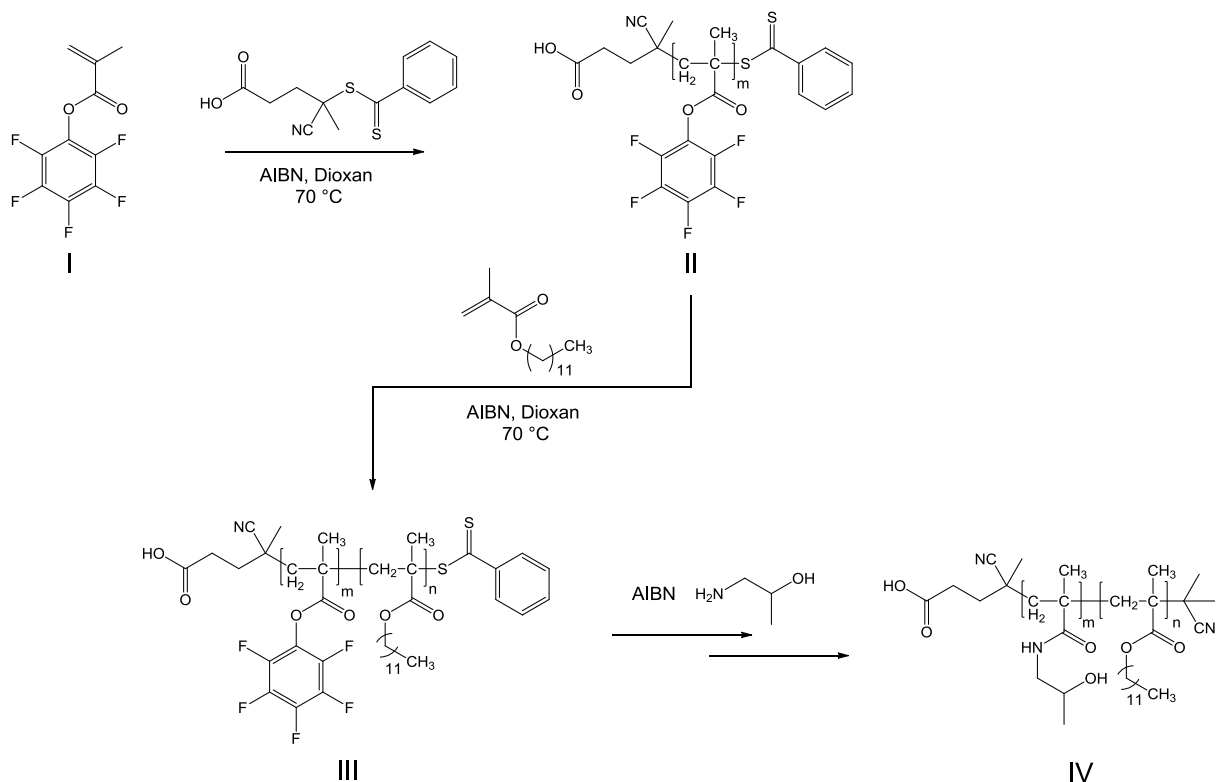


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Synthese von PS- bzw. PDLLA-Partikeln mittels Kombination aus direkter Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfung. Modifiziert nach.<sup>50</sup>

## 4 Material und Durchführung

Diese Methode fand hauptsächlich Anwendung in der Nanopartikel-Synthese. Im Gegensatz zur Partikelherstellung durch direkte und radikalische Miniemulsionspolymerisation wurden hierbei bereits synthetisierte Polymere zur Partikelbildung eingesetzt. Dadurch wurde auf die Verwendung von Monomeren verzichtet und somit sichergestellt, dass keine Monomer-Reste nach erfolgter Partikelherstellung vorhanden waren, die einen toxischen Einfluss auf Zellen haben könnten. Außerdem können dadurch auch komplexere Polymere zur Herstellung der Nanopartikel verwendet werden, deren Herstellung mit der Miniemulsionspolymerisation eine große Herausforderung wäre. Die Synthese aller verwendeten Polymere wird in der Veröffentlichung von Kelsch *et al.*<sup>175</sup> sehr ausführlich erläutert. Es sei aber an dieser Stelle erwähnt, dass das Tensid, welches zur Stabilisierung der PDLLA- und PS-Partikel genutzt wurde, aus dem amphiphilen Block-Copolymer P(HPMA)-*b*-P(LMA) bestand, das *via* RAFT-Polymerisation in Kombination mit Reaktivestern von Annette Kelsch synthetisiert wurde (Abbildung 21). Diese soll nachfolgend kurz beschrieben werden.



**Abbildung 21:** Übersicht zur Darstellung des stabilisierenden Block-Copolymers P(HPMA)-*b*-P(LMA), das mittels RAFT-Polymerisation in Kombination mit Reaktivestern synthetisiert wurde. I: PFPMA, II: P(FPMA), III: P(FPMA)-*b*-P(LMA), IV: P(HPMA)-*b*-P(LMA).



Zu Beginn wurde der Reaktivester Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA, Abbildung 21, I) mittels RAFT-Polymerisation unter Verwendung des Kettenübertragungsmittels (*engl.*: chain transfer agent, CTA) 4-Cyano-4-thiobenzoylsulfanylpentansäure zu Poly(pentafluorphenylmethacrylat) (P(PFPMA), Abbildung 21, II) umgesetzt. Dieses Homopolymer wurde anschließend als Makro-CTA in einer weiteren RAFT-Polymerisation mit Laurylmethacrylat (LMA) eingesetzt, wodurch das Block-Copolymer Poly(pentafluorphenylmethacrylat)-*b*-Poly(laurylmethacrylat) (P(PFPMA)-*b*-P(LMA), Abbildung 21, III) gebildet wurde. Dieses reaktive Copolymer wiederum konnte, nach vollständigem Entfernen der Dithioester-Endgruppe, in einer polymeranalogen Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin in Poly(hydroxypropylmethacrylamid)-*b*-Poly(laurylmethacrylat) (P(HPMA)-*b*-P(LMA), Abbildung 21, IV) umgesetzt werden.

Das so hergestellte Block-Copolymer P(HPMA)-*b*-P(LMA) ist biokompatibel<sup>176-177</sup> und macht eine aufwendige Aufreinigung wie etwa zeitintensives Dialysieren der Nanopartikeldispersion unnötig, was einen großen Vorteil zu herkömmlichen Tensiden wie SDS darstellt.

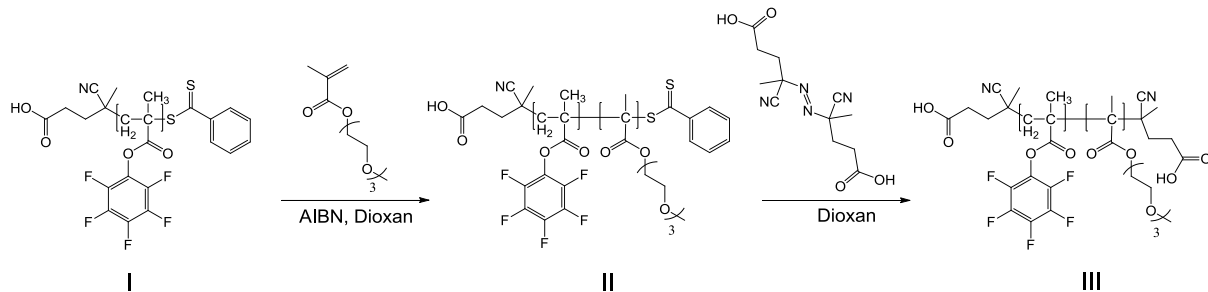
Aufgrund der Synthesemethode des Block-Copolymers können verschiedene Funktionalitäten wie etwa diverse Fluoreszenz-Farbstoffe an den hydrophilen Teil des Block-Copolymers kovalent angebunden oder im hydrophoben PS- oder PDLLA-Kern des Partikels eingeschlossen werden. Die unterschiedlichen Arten der Markierung dienen dazu, Aufschluss über einen möglichen Aufnahmemechanismus zu gewinnen, wie ein hydrophober Wirkstoff in Zellen gelangen könnte.

#### 4.2.1.3 Nanohydrogelpartikel

Als Grundlage zur Darstellung kationischer Nanohydrogelpartikel wurden amphiphile Reaktivester-Block-Copolymere verwendet, die zur Selbstorganisation (*engl.* self-assembly) neigen. Die Synthese dieses Block-Copolymers wurde von Lutz Nuhn durchgeführt. Dabei wurden die Vorläuferpolymere auf ähnliche Weise, wie bereits in 4.2.1.2 vorgestellt, über RAFT-Polymerisationen hergestellt.

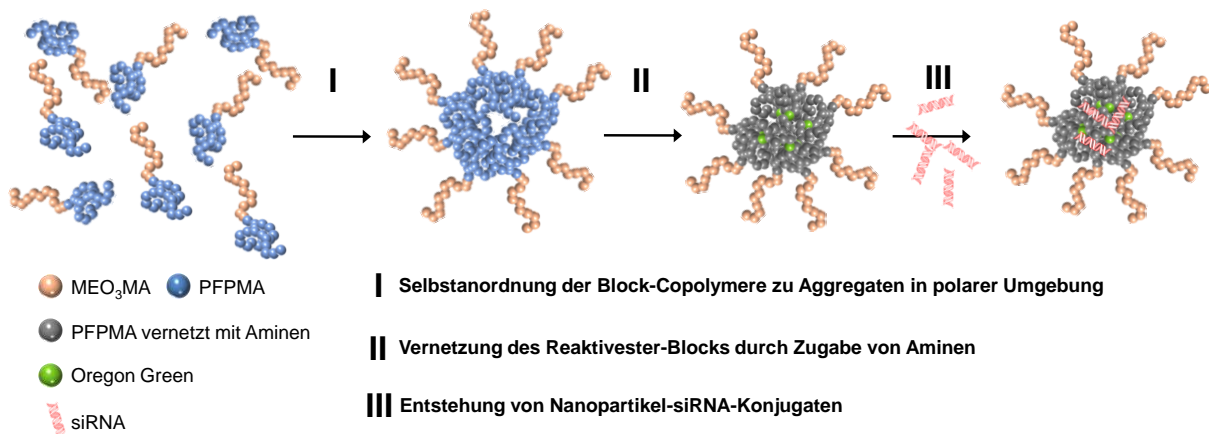
Der Reaktivester P(PFPMA) (Abbildung 22, I) wurde als Makro-CTA einer RAFT-Polymerisation mit Tri(ethylenglycol)methylethermethacrylat (MEO<sub>3</sub>MA) unterzogen, woraus das Block-Copolymer Poly(pentafluorphenylmethacrylat)-*b*-Poly((triethylenglycol)methylethermethacrylat) (P(PFPMA)-*b*-P(MEO<sub>3</sub>MA)) mit einer Dithiobenzoat-Endgruppe entstand (Abbildung 22, II). Durch Abspalten dieser Endgruppe mittels 4,4'-Azo-bis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) nach Perrier *et al.*<sup>178</sup> erhielt man das Block-Copolymer P(PFPMA)-*b*-P(MEO<sub>3</sub>MA), welches in polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie

Dimethylsulfoxid (DMSO) Polymer-Aggregate im Nanometerbereich *via* Selbstorganisation ausbildet.



**Abbildung 22:** Schema der Darstellung des amphiphilen Block-Copolymers P(PFPMA)-*b*-P(MEO<sub>3</sub>MA) (III) aus P(PFPMA) (I) nach der Umsetzung mit MEO<sub>3</sub>MA zu P(PFPMA)-*b*-P(MEO<sub>3</sub>MA), das eine Dithiobenzoat-Endgruppe (II) trug. Die Abspaltung des Dithioesters erfolgte mit ACVA. Modifiziert nach.<sup>179</sup>

Der hydrophobe Kern der Polymer-Aggregate, der aus den Reaktivesterblöcken des Block-Copolymers ausgebildet wurde, konnte durch die Anwendung polymeranaloger Reaktionen mit Aminen (in diesem Fall Spermin) vernetzt und so in ein biokompatibles Polymer umgewandelt werden (Abbildung 23, Schritt II), indem die Pentafluorphenyl-Reste umgesetzt und vollständig entfernt wurden (quantitativer Nachweis mittels <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie). Die so entstandenen Nanohydrogelpartikel waren aufgrund der Amine im Kern bei physiologischem pH-Wert protoniert. Als Polykationen waren sie in der Lage, siRNA, welche aufgrund des Phosphodiester-Rückgrats als Polyanion vorlag, zu komplexieren. Die einzelnen Schritte zur Entstehung der Nanohydrogelpartikel einschließlich der Komplexierung von siRNA ist in Abbildung 23 skizziert.



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung der Bildung von Nanohydrogelpartikeln, die mit siRNA beladen werden können. Die einzelnen Schritte sind in der Abbildung selbst erklärt. Modifiziert nach.<sup>179</sup>

Die Markierung der Partikel erfolgte durch die kovalente Anbindung des Fluorophors Oregon Green, indem die Vorteile der Verwendung von Reaktivestern ausgenutzt wurden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Partikel mittels CLSM zu detektieren und Aufschluss über den intrazellulären Verbleib derselben zu erlangen.

#### 4.2.2 Zellkultur

Die Zelllinien HeLa und MCF-7 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Die Zelllinie MSC wurde aus dem Knochenmark nach Einverständniserklärung eines gesunden Spenders und Genehmigung durch die ortsansässige Ethikkommission in Ulm gewonnen und nach literaturbekanntem Protokoll kultiviert.<sup>174</sup> Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versehen mit verschiedenen Zusätzen und ohne Phenolrot, in Kultur gehalten. DMEM für MSCs wurde mit 20% fötalem Kälberserum (FCS), 100 Einheiten Penicillin zusammen mit 100 µg/mL Streptomycin, 12 µg/mL Ciprofloxacin, 1 mM Pyruvat und 2 mM GlutaMAX™ versetzt. Dem entsprechenden Medium für HeLa-Zellen wurden 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin zusammen mit 100 µg/mL Streptomycin und 2 mM GlutaMAX™ zugesetzt. Das Medium für MCF-7 enthielt neben allen Zusätzen, die auch das HeLa-Medium aufwies, noch 1 mM Pyruvat. Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen Tissue culture Cellstar® (175 cm<sup>2</sup>) in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert bzw. mit Nanopartikeln sowie –kapseln inkubiert. Vor der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mittels 0,5%iger Trypsinlösung abgelöst und je nach Versuch in Kulturgefäße von IBIDI®, 96-Well-Platten oder 6-Well-Platten ausgesät. Die Zelldichte betrug dabei 20.000-50.000 Zellen/mL für Versuche in Kulturgefäßen von IBIDI®, 8.000 Zellen/Well für Versuche in 96-Well-Platten und 200.000 Zellen/Well für Versuche in 6-Well-Platten. Nachdem die Zellen über Nacht wieder adhärieren konnten, wurde am nächsten Tag die Partikel- bzw. Kapselinkubation im Medium durchgeführt, nachdem das alte Medium entfernt und die Zellen mit Dulbecco's buffered phosphate saline (PBS) gewaschen wurden. Die Partikel- bzw. Kapselkonzentrationen betragen dabei, je nach Versuchskonzept, zwischen 75-1.200 µg/mL. Die Zellen wurden, je nach Versuch, zwischen ½ h und 72 h mit diesen Partikel- bzw. Kapselkonzentrationen inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen, nachdem das alte Medium entfernt wurde, dreimal mit PBS gewaschen. Färbungen der Mitochondrien, Lysosomen oder der Zellmembran schlossen sich an, wenn die Zellen am CLSM untersucht wurden. Diese Anschlussfärbungen sind im Folgenden beschrieben. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass alle Versuche, mit Ausnahme der Immunfluoreszenzfärbung, an lebenden Zellen durchgeführt wurden.

### *Mitochondrienfärbung mittels MitoTracker® Green FM*

Die Zellen wurden nach der Inkubation mit Partikeln respektive Kapseln dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,2  $\mu\text{L}$  MitoTracker® Green FM (1 mM Stammlösung, gebrauchsfertig vom Hersteller) in 1 mL PBS (versetzt mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) verdünnt und die Zellen damit für 30 min bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann entweder direkt am CLSM detektiert oder weitere Zellkompartimente durch Anschlussfärbungen markiert.

### *Lysosomenfärbung mittels LysoTracker® Red*

Nach erfolgter Inkubation mit nanopartikulären Systemen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit Medium überschichtet und mit 0,04  $\mu\text{L}$  LysoTracker® Red (1 mM Stammlösung, gebrauchsfertig vom Hersteller) versetzt. Die Zellen wurden 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann entweder direkt am CLSM detektiert oder weitere Zellkompartimente durch Anschlussfärbungen markiert.

### *Zellmembranfärbung mittels CellMask™ Orange oder CellMask™ Deep Red*

Nachdem die ausgesäten Zellen einmal (bei Partikelinkubation dreimal) mit PBS gewaschen wurden, erfolgte das Anfärben der Zellmembranen mittels CellMask™-Membranfarbstoffe. Je nach dem, ob schon andere Färbungen erfolgt waren, fiel die Auswahl des Farbstoffs auf CellMask™ Orange oder CellMask™ Deep Red (CDR), die sich in ihren Anregungs- und Emissionsspektren unterschieden. Zum Anfärben lebender Zellen wurden 0,2  $\mu\text{L}$  des Farbstoffs (5 mg/mL Stammlösung in DMSO, gebrauchsfertig vom Hersteller) in 1 mL Medium oder PBS verdünnt und die Zellen am CLSM nach kurzer Wartezeit detektiert.

### **4.2.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie**

Die Methode der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wurde vor allem verwendet, um die Aufnahme nanopartikulärer Systeme nachzuweisen und eine mögliche Freisetzung von Partikel- oder Kapselinhalten zu detektieren. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten der Zellen mit diversen nanopartikulären Systemen unterschiedlicher Konzentration und Anfärben verschiedener Zellorganellen erfolgte die Detektion unter Verwendung eines Leica

TCS SP5 II Mikroskops, ausgestattet mit folgenden Laser-Kombinationen: Argon: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm; DPSS: 561 nm; HeNe: 594 nm, 633 nm. Für die Aufnahmen wurde ein Öl-Objektiv HCX PL APO CS 63×/1.4-0.6 verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte unter Verwendung der Software LAS AF 2.6.0.7266 von Leica, wobei ein zweifaches „Oversampling“ beachtet wurde. Die Bildgröße betrug jeweils 1024×1024 8-bit-Pixel. Um die Phänomene „Crosstalk“ und Durchbluten möglichst gering zu halten, wurden sequenzielle Scans durchgeführt, wodurch jeder Farbstoff innerhalb einer Probe einzeln nacheinander mit entsprechenden Lasern angeregt und detektiert wurde. Die Emissionsbänder der PMTs wurden den verwendeten Fluorophoren angepasst und sind zusammen mit den entsprechenden Laserlinien zur Anregung der Fluorophore in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Auflistung der gewählten Laserlinien und Emissionsbänder der PMTs zur Anregung bzw. Detektion entsprechender Fluorophore.**

Fluorophor	was wird markiert	$\lambda(\text{ex, max})^{\text{a)}$ in nm	verwendete Laserlinie in nm	$\lambda(\text{em, max})^{\text{b)}$ in nm	Emissionsband des PMTs in nm
<b>Alexa Fluor® 633</b>	sekundärer Antikörper	632	633	647	650-695
<b>Bodipy</b>	Polymerkerne der NPs	504	488	527	505-550
<b>CellMask™ Deep Red</b>	Zellmembran	649	633	666	655-730
<b>CellMask™ Orange</b>	Zellmembran	554	561	567	590-640
<b>Cy3</b>	Oligonukleotide	550	561	570	570-610
<b>Cy5</b>	Oligonukleotide	649	633	670	655-730
<b>LysoTracker® Red</b>	Lysosomen	577	561	590	575-610
<b>MitoTracker® Green FM</b>	Mitochondrien	490	488	516	505-545
<b>Oregon Green</b>	Block-Copolymer von NPs und NHPs	490	488	514	500-550
<b>PMI</b>	Polymerkerne der NPs	488	488	525	505-545
<b>TAMRA</b>	PBCA-Hülle der NKs	546	561	579	570-625
<b>Texas Red</b>	Block-Copolymer von NPs	586	561	605	580-640

<sup>a)</sup> Maximum der Anregung. <sup>b)</sup> Maximum der Emission.

Die verwendete Laserlinie wurde entsprechend des Anregungsmaximums ausgewählt. Das Emissionsband wurde jeweils dem Maximum der Fluoreszenz angepasst.

### 4.2.4 Herabsetzen des mitochondrialen Membranpotentials mittels DNP

MSCs wurden 24 h mit **NK1** (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Mitochondrienfärbung durch MitoTracker® Green FM gemäß 4.2.2. Zellen, die nicht mit Dinitrophenol (DNP) versetzt wurden, sind einmal mit PBS gewaschen, mit 500  $\mu\text{L}$  PBS bedeckt und anschließend über einen Zeitraum von 3 min detektiert worden, wobei alle 10 s ein Bild aufgenommen wurde. Die verwendeten Laser und Emissionsbänder der PMTs sind Tabelle 6 zu entnehmen. Dieselbe Vorgehensweise wurde auch für Zellen gewählt, die mit DNP behandelt wurden. Allerdings wurden die Aufnahmen erst gestartet, nachdem 500  $\mu\text{L}$  einer 250  $\mu\text{M}$  DNP-Lösung anstatt reine Pufferlösung dazugegeben wurde. Die Bildbearbeitung erfolgte anschließend mit der Auswertesoftware LAS AF lite und der Software Image J.

### 4.2.5 Durchflusszytometrie

Nachdem HeLa-Zellen mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät wurden, erfolgte am nächsten Tag die Partikelinkubation (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) über 1 und 8 h mit **NP8**. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen nach 1 Waschschrift mit PBS mit 400  $\mu\text{L}/\text{Well}$  Trypsin abgelöst und der Verdauungsprozess mit jeweils 400  $\mu\text{L}/\text{Well}$  Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL PBS aufgenommen. Nach Filtration und Überführen der Zellen in ein Messröhrchen schloss sich die Analyse mittels Durchflusszytometer (CyFlow ML) an. Neben der Vermessung der Zellen im SSC und FSC wurde das Signal von PMI mit FL1 bei 527 nm detektiert, wobei ein Laser der Wellenlänge  $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$  (40 mW) zur Anregung verwendet wurde. Das zweite Fluorophor Texas Red wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt und mit FL5 bei 610 nm detektiert. Die resultierenden Punktwolkendarstellungen (*engl.* dot plots) und Histogramme wurden mit der Software FCSEXPRESS V4 ausgewertet und die in 5.2.4 dargestellten Ergebnisse mittels Normierung auf die Fluoreszenzintensität von Texas Red berechnet. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten der Fluorophore PMI und Texas Red erfolgte dabei am Mikrotiterplattenleser. Folgende Vorgehensweise wurde für die Normierung gewählt:

- a) Zunächst wurden die Fluoreszenzintensitäten von PMI und Texas Red am Mikrotiterplattenleser ermittelt, wobei  $\lambda(\text{em})$  und  $\lambda(\text{ex})$  für die jeweiligen Fluorophore gemäß der Messung am Durchflusszytometer angepasst wurden. Anhand einer Dreifachmessung wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten ( $\overline{FI}$ ) der Fluorophore A ( $\triangleq$  Texas Red) und B ( $\triangleq$  PMI) bestimmt.
- b) Die erhaltenen Mittelwerte wurden durch Division in Relation zueinander gesetzt, woraus sich ein Wert von  $x = 1$  und ein Wert  $0 \leq y \leq 1$  ergibt. Nach Konvention wird der größere der beiden Mittelwerte als Divisor eingesetzt, beispielsweise wie folgt:

$$x = \frac{\overline{FI}_A}{\overline{FI}_A} = 1 \quad \text{sowie} \quad y = \frac{\overline{FI}_B}{\overline{FI}_A} < 1 \quad \text{mit} \quad \overline{FI}_A > \overline{FI}_B \quad (\text{Gl.4})$$

- c) Die daraus resultierenden Werte  $x$  und  $y$  wurden jeweils dafür verwendet, um den aus den Messungen der Durchflusszytometrie ermittelten Median  $m$  der Fluorophore A und B durch Division zu normieren:

$$m_{A,i}(\text{normiert}) = \frac{m_{A,i}}{x} \quad \text{sowie} \quad m_{B,i}(\text{normiert}) = \frac{m_{B,i}}{y} \quad (\text{Gl.5})$$

- d) Die Mittelwerte der normierten Mediane ( $\overline{m}_A(\text{normiert})$  sowie  $\overline{m}_B(\text{normiert})$ ) wurden im Diagramm aufgetragen.

#### 4.2.6 FRET-Messungen

Versuche zur Ermittlung der FRET-Eigenschaften des Cy3/Cy5-markierten Oligonukleotids wurden anhand von reinen Oligolösungen ohne Zellen am Mikrotiterplattenleser (Infinite M1000) durchgeführt. Dazu wurden sowohl 3D-Scans der doppelt markierten als auch der einfach markierten Oligos (60 nM) im Vergleich bei  $\lambda(\text{ex}) = 561$  und 633 nm sowie  $\lambda(\text{em}) = 500-700$  nm vermessen. Anschließend erfolgten die *in vitro* Versuche mit HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit **NK2** (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit 60 nM Oligonukleotidkonzentration) inkubiert (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Nachdem zuerst mit einem Laser der Linie 561 nm angeregt wurde, erfolgte die Anregung der gleichen Region innerhalb der Probe im Anschluss mit

einem Laser der Linie 633 nm. Die Detektion beider Fluorophore erfolgte jeweils simultan. Dabei wurde Cy3 bei 570-610 nm und Cy5 bei 655-730 nm detektiert.

### 4.2.7 Toxizitätstest *via* MTS-Assay

Um zu zeigen, dass die verwendeten Nanopartikel und –kapseln keinen toxischen Einfluss auf Zellen haben, wurde ein Toxizitätstest hinsichtlich der Zellviabilität mit Hilfe des MTS-Assays durchgeführt. MTS (3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Salz) wird NADH-abhängig von Zellen in Formazan umgesetzt (Abbildung 24). Dabei wird MTS unter Oxidation des NADH in  $\text{NAD}^+$  zu Formazan reduziert, welches in Zellkulturmedien löslich ist. Es sei erwähnt, dass  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) in tierischen Zellen die reduzierte und NADH die oxidierte Form eines Coenzym in der Atmungskette darstellt. Die Konzentration des gefärbten Formazans wurde am Mikrotiterplattenleser (Infinite M1000) photometrisch mittels Absorption bei 490 nm bestimmt. Dabei ist das Absorptionssignal proportional zur Anzahl lebender Zellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 8.000 Zellen/Well in 96-Well-Platten (Becton Dickinson, USA) ausgesät und am nächsten Tag mit den entsprechenden Nanopartikeln bzw. –kapseln 72 h im Brutschrank (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der MTS-Assay gemäß dem Protokoll von CellTiter 96® A<sub>Queous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA) durchgeführt.

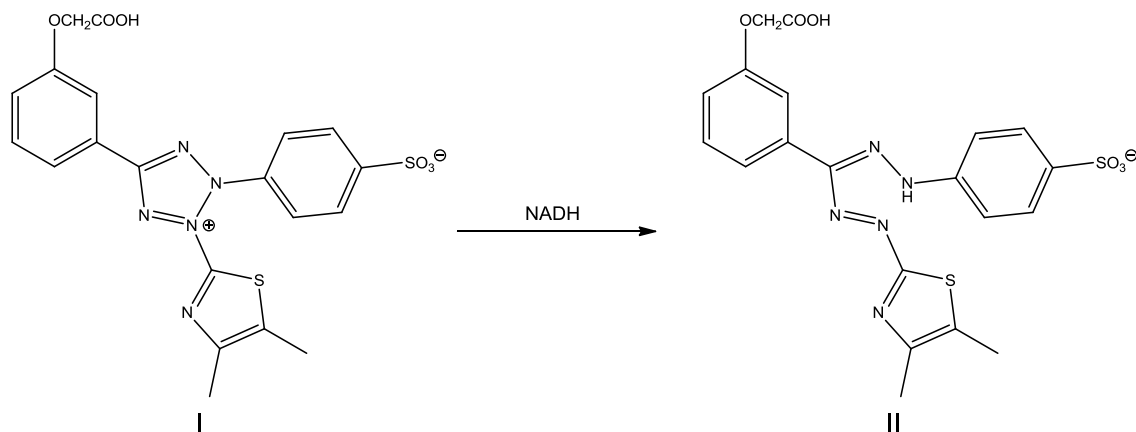


Abbildung 24: Umsetzung von MTS (I) durch NADH-induzierte intrazelluläre Prozesse zum Formazan (II). Modifiziert nach.<sup>46</sup>

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass bei der Auswertung die Zellviabilität unbehandelter Zellen (Kontrolle) auf 100% festgesetzt wurde und die Daten der mit Nanopartikeln/-kapseln behandelten Zellen darauf normiert wurden.



#### 4.2.8 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von „Lipid Droplets“

Nachdem HeLa-Zellen mit einer Dichte von 8.500 Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät wurden, schloss sich die Immunfluoreszenzfärbung nach Readhärieren über Nacht und 2-stündiger Partikelinkubation an. Die Vorgehensweise wurde im Allgemeinen von Hofmann *et al.* übernommen.<sup>180</sup> Die Zellen wurden zuerst 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit einem Gemisch aus 4%igem PFA und 0,025%igem Glutaraldehyd fixiert. Im Anschluss wurde die Zellmembran mit einer 0,1%igen Saponinlösung 10 min ebenfalls bei RT permeabilisiert und, nachdem mit 3%igem BSA (bovines Serumalbumin) 10 min blockiert wurde, die Inkubation mit dem Primär-Antikörper TIP47 für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten mit 0,1%iger BSA-Lösung schloss sich die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper anti-Guinea-PIG-Alexa Fluor® 633 an, welche ebenfalls für 30 min bei 37 °C ablief. Nachdem nochmals mit 0,1%iger BSA-Lösung gewaschen wurde, konnte die Detektion am CLSM erfolgen, wobei der Sekundär-Antikörper, welcher die „Lipid Droplets“ markierte, mit  $\lambda(\text{ex})=633$  nm angeregt und bei  $\lambda(\text{em})=650-695$  nm detektiert wurde. Das PMI aus den Partikeln wurde mit einem Laser der Wellenlänge  $\lambda=488$  nm angeregt und bei  $\lambda(\text{em})=505-545$  nm detektiert.

#### 4.2.9 Datenauswertung mit Volocity®

Die quantitative Auswertung von CLSM-Aufnahmen wurde mit der Bildbearbeitungssoftware Volocity® 6.1.2 (PerkinElmer) durchgeführt. Dabei musste u. a. auf die Notwendigkeit des Einstellens eines „Thresholds“ geachtet werden, um mögliche Hintergrundsignale zu entfernen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde dieser manuell eingestellt und für jedes untersuchte Bild gleich gelassen. Das automatische, separate Festlegen des „Thresholds“ für jedes Bild würde dazu führen, dass sich der „Threshold“ immer leicht unterscheiden könnte, wodurch eventuell die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflusst werden könnte. Das manuelle Festlegen birgt natürlich auch eine Fehlerquelle in sich, da nicht garantiert werden kann, dass der gleichbleibende „Threshold“ für jedes Bild optimal ist. Weiterhin ist zu betonen, dass für alle Analysen zuerst Einzelzellen aus Gesamtbildern separiert wurden, um anschließend eine Statistik hinsichtlich Mittelwertbildung und Standardabweichung durchführen zu können. Nachfolgend sind im Einzelnen die Vorgehensweisen zur Bildanalyse der unterschiedlichen Fragestellungen erläutert.

### *Quantitative Auswertung der Kolokalisation von Cy5-Oligos und Mitochondrien unter 5.1.3*

Nachdem die Einzelzellen separiert wurden, ist bei jeder Zelle das gleiche Messprotokoll hinsichtlich Kolokalisation angewendet worden. Dazu wurde unter Programm-Option „Colocalization“ der Software ein „Threshold“ für jeden Kanal manuell festgelegt (Tabelle 7). Die jeweiligen „Thresholds“ wurden in Kombination mit der Software LAS AF ermittelt.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der festgelegten „Thresholds“ anhand der Grauwerte für MitoTracker® und Cy5 für jede verwendete Zelllinie.**

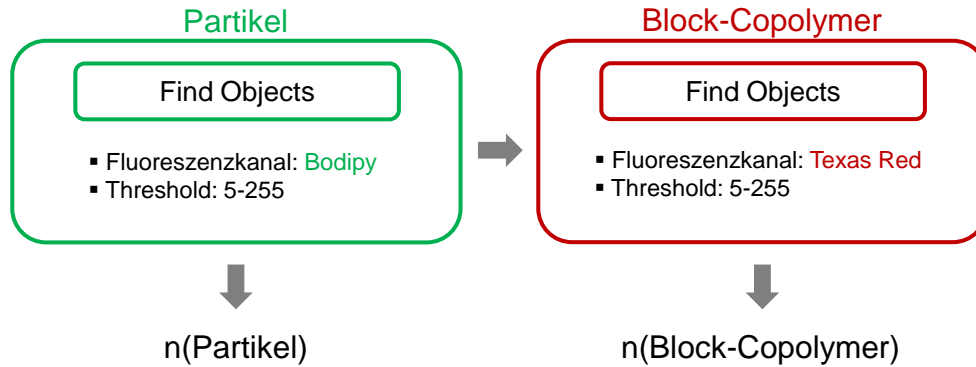
Zelllinie	MitoTracker®	Cy5
HeLa	35-255	25-255
MSC	25-255	15-255
MCF-7	5-255	2-255

Die entsprechenden Kanäle wurden im Vorfeld ausgewählt. Anschließend wurde durch den Befehl „Generate Colocalization“ eine Datentabelle generiert, in welcher u. a. die Kolokalisationskoeffizienten „Manders‘ Coefficients“ M1, M2 sowie das Verhältnis der Pixel beider, auf Kolokalisation untersuchte Fluorophore (MitoTracker®, Cy5), enthalten waren. Diese Daten wurden für weitere Analysen mit anderer Software (Excel, Origin) verwendet. Für jede Inkubationszeit wurden 30-50 Zellen untersucht.

### *Quantifizierung der Flächen der Fluoreszenzspots doppelt markierter Partikel unter 5.2.7*

Volocity® kann nicht nur für die Auswertung von Kolokalisation genutzt werden, sondern erweist sich auch als besonders effektiv, um Objekte innerhalb Zellen ausfindig zu machen, zu zählen und deren flächenmäßige Größe zu bestimmen. Dies wurde für die Auswertung **NP9**-inkubierter HeLa-Zellen durchgeführt, um einen weiteren Hinweis zu erlangen, ob ein intrazelluläres Ablösen des stabilisierenden Block-Copolymers möglicherweise erfolgt war. Die Anzahl der Fluoreszenzspots Bodipy-markierter Partikelkerne und Texas Red-markierter Block-Copolymere wurde dabei separat ermittelt. Dafür wurde der Befehl „Find Objects“ unter Programm-Option „Measurements“ der Software für jeden Fluoreszenzkanal einzeln angewendet. Dabei wurden Anzahl sowie Flächengröße der ermittelten Objekte *via* „Make Measurement Item“ in eine Datentabelle übertragen. Diese Daten wurden danach weiter mittels Excel und Origin ausgewertet. Zum besseren Verständnis der Abfolge des Messprotokolls soll Abbildung 25 beitragen. Für beide Inkubationszeiten (8 und 24 h) wurden 20 Zellen einzeln untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass nur das Zellinnere

untersucht wurde, um Datenverfälschungen aufgrund von nur anhaftenden Partikeln zu vermeiden.



**Abbildung 25: Befehlsabfolge in Volocity® zur Ermittlung der Anzahl an Fluoreszenzspots  $n$ , die durch Partikel oder Block-Copolymer hervorgerufen wurden.**

#### *Quantitative Auswertung der Kinetikstudien unter 5.3.4 und 5.3.7*

Bevor die eigentliche Analyse der CLSM-Aufnahmen durchgeführt wurde, ist von jeder Einzelzelle der Bereich des Zytoplasmas ausgeschnitten worden, um zu verhindern, dass anhaftende Partikel an der Zellmembran die Ergebnisse verfälschen. Für jede Inkubationszeit wurden mindestens 10 Zellen untersucht.

Zunächst wurde das Verfahren, das bereits bei der Ermittlung der Kollokalisierung von MitoTracker® und Cy5 zum Tragen kam, angewendet. Die Prozedur wurde an die entsprechenden Fluoreszenzkanäle von Oregon Green (markiert Partikel) und LysoTracker® (markiert Lysosomen) angepasst. Der „Threshold“ wurde für beide Kanäle auf 5-255 festgelegt und die generierten Daten hinsichtlich M1, M2 und Pixel-Verhältnis weiter ausgewertet.

Weiterhin wurde die Anzahl der Partikel, die im Zytoplasma vorlagen bestimmt, indem der Befehl „Find Objects“, der bereits beschrieben wurde, auf jeweils 10 Zellen angewendet wurde. Um zusammenhängende Objekte (d. h. Partikel) voneinander trennen zu können, wurde dieser Befehl um die Option „Separate Touching Objects“ erweitert. Der „Threshold“ wurde für Partikel **NHP1** auf 3-255 und für **NHP2** auf 20-255 festgelegt. Diese Unterschiede im „Threshold“ resultierten aus den unterschiedlich starken Fluoreszenzintensitäten, die die verschiedenen Partikel aufwiesen.

## 5 Resultate und Diskussion

Anhand der nachfolgenden Kapitel soll gezeigt werden, dass bei allen verwendeten nanopartikulären Systemen eine Freisetzung ihres Inhaltes nachgewiesen werden konnte, wodurch diese polymeren Trägersysteme ein hohes Potential für die Anwendung im Bereich „Drug Delivery“ aufweisen. Neben der Freisetzung von Wirkstoffmodellen wird auf den Verbleib des polymeren Trägermaterials eingegangen. Die doppelte Fluoreszenzmarkierung von Trägermaterial und dessen Inhalt (Wirkstoffmodell) schuf die Basis, um beide Komponenten getrennt voneinander zu detektieren und die intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen.

### 5.1 PBCA-Nanokapseln als Trägersystem für Oligonukleotide

Aus früheren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe Mailänder ging hervor, dass PBCA-Kapseln, in welchen Cy5-Oligos verkapselt waren, eine Freisetzung der Oligos zur Folge hatte, nachdem die Kapseln in Zellen aufgenommen wurden.<sup>181</sup> Lorenz *et al.* zeigten dabei, dass die Kapseln sehr gut von Zellen aufgenommen wurden. Im Besonderen wurden MSCs hinsichtlich einer intrazellulären Freisetzung der Cy5-markierten Oligos untersucht, wobei der Fokus auf einer Langzeitfärbung von Mitochondrien durch diese Oligos lag. Jedoch blieben Fragen nach einem möglichen Abbau der Oligonukleotide oder dem intrazellulären Verbleib des Kapselmaterials offen.

Die folgenden Ergebnisse sollen die Freisetzung von Cy5-markierten Oligonukleotiden in verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Kinetik und deren Quantifizierung demonstrieren. Vorab wurde getestet, ob die Kapseln bei höherer Konzentration einen toxischen Einfluss auf die Zellen ausübten. Außerdem soll gezeigt werden, warum eine Anlagerung der freigesetzten Oligos an Mitochondrien erfolgte und ob ein intrazellulärer Abbau der Oligos vorlag. Durch die Fluoreszenzmarkierung von Kapselhülle und Kapselinhalt konnten beide Komponenten getrennt voneinander detektiert werden. Dadurch konnte die intrazelluläre Lokalisation von Kapselmaterial und Kapselinhalt untersucht werden, wodurch ein Anhaltspunkt für den Verbleib der polymeren Kapselhülle erhalten wurde. Alle Nanokapseln, die für diese Studie verwendet wurden, sind von Frau Dr. Grit Baier hergestellt worden. Auf die Synthese wurde bereits in Kapitel 4.2.1 eingegangen. Weitere Eigenschaften wie Größe, Zetapotential oder Zusammensetzung können Tabelle 1 (Kapitel 4.1.2) entnommen werden. Abbildung 26 zeigt PBCA-Nanokapseln, die mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) detektiert wurden. Diese Aufnahme soll stellvertretend für alle verwendeten PBCA-Kapseln darlegen, dass eine Kern-Hüll-Struktur vorlag, die schematisch in Abbildung 26 B) dargestellt ist.

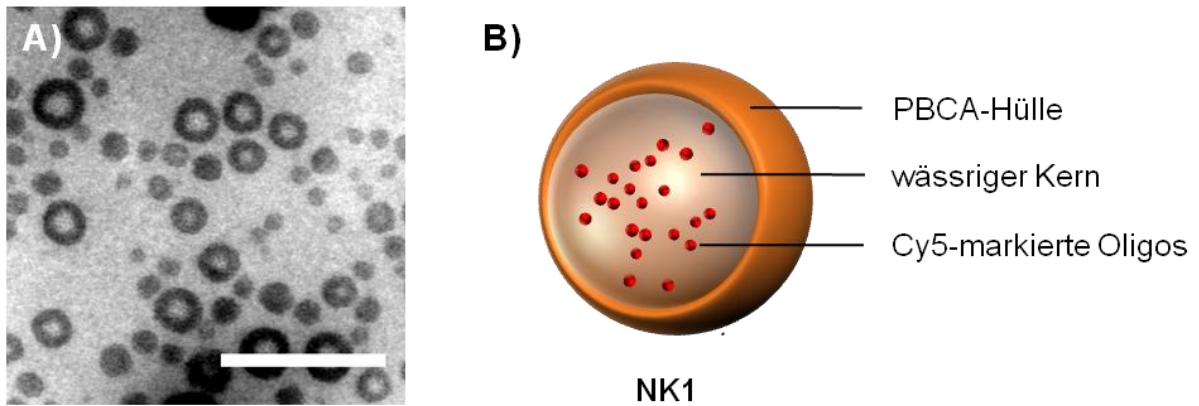


Abbildung 26: TEM-Aufnahme von PBCA-Kapseln (A) und schematische Darstellung der PBCA-Kapsel NK1 (B). Der Größenbalken beträgt 500 nm. Die Aufnahme wurde von Dr. Grit Baier angefertigt.

### 5.1.1 Toxizitätstest auf der Grundlage eines MTS-Assays

MSCs reagieren von den ausgewählten Zelllinien am sensibelsten auf Einflüsse ihrer Umgebung und sind dadurch am besten geeignet für diesen Toxizitätstest. Der Test bezieht sich auf die Inkubation von **NK1** als repräsentative Kontrolle für alle eingesetzten Kapseln. Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte bis zu einer Kapselkonzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kein toxischer Einfluss festgestellt werden (Abbildung 27). Die Zellviabilität lag deutlich oberhalb 80% im Vergleich zur Kontrolle (Zellen, die nicht mit **NK1** inkubiert wurden).

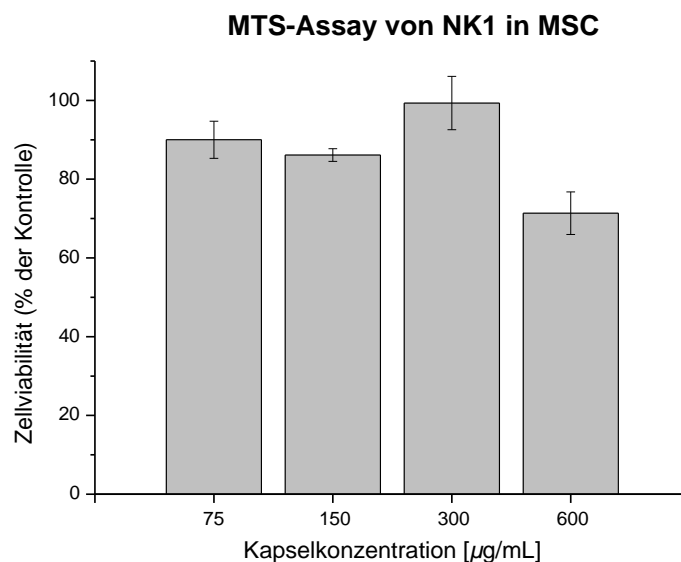


Abbildung 27: MTS-Assay der repräsentativen Kapsel NK1 in MSC nach 72 h. Die Nanokapseln waren bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nicht toxisch.

Erst ab einer Kapselkonzentration von 600  $\mu\text{g/mL}$  lag die Zellviabilität bei unter 80% im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch konnte der auftretende toxische Einfluss bei dieser extrem hohen Konzentration außer Acht gelassen werden, da in weiterführenden Experimenten nur Kapselkonzentrationen eingesetzt wurden, die deutlich unterhalb dieser Konzentration lagen.

### 5.1.2 Kinetikstudie über die Aufnahme der Nanokapseln und die Freisetzung Cy5-markierter Oligonukleotide

Neben den pathogenen Zelllinien, HeLa und MCF-7, wurden zum Vergleich MSCs als primäre Zellen für die Zellversuche ausgewählt, um eventuelle Unterschiede zwischen Krebszellen und „gesunden“ Zellen in Bezug auf Kapselaufnahme und Oligofreisetzung zu erkennen. Die Kinetikstudie erfolgte innerhalb eines Inkubationszeitraums von 2, 5, 9, 16, 24 sowie 48 h und einer Kapselkonzentration von 75  $\mu\text{g/mL}$ . Alle Zelllinien wurden so kultiviert, dass für die mikroskopischen Aufnahmen nicht-konfluente Monolagen zur Verfügung standen, wodurch die nachfolgende quantitative Auswertung der Kinetikstudie erleichtert wurde. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie konnten Aufnahmen erzeugt werden, die die Kolokalisation von Cy5-markierten Oligos und simultan gefärbten Mitochondrien aufzeigten. Abbildung 28 soll deutlich machen, wie die Signale auf den nachfolgenden CLSM-Aufnahmen interpretiert werden können.

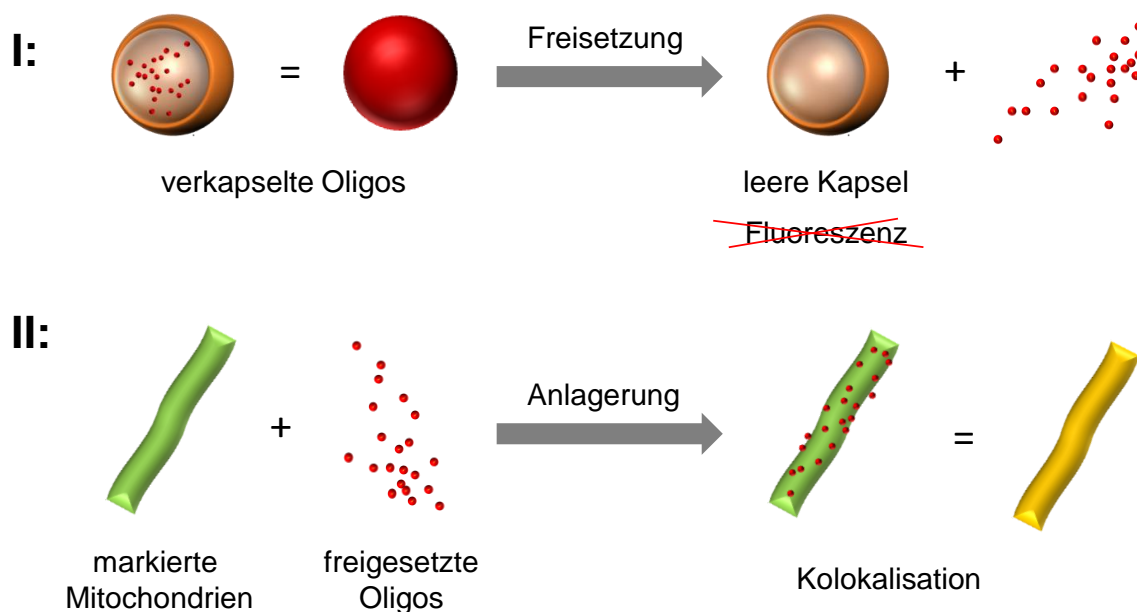


Abbildung 28: Schema der fluoreszenzmarkierten Oligos und Mitochondrien. I: Verkapselte Oligos sind als punktförmige, rot gefärbte Objekte in den Aufnahmen zu erkennen. II: Markierte Mitochondrien erscheinen als fadenförmige Strukturen grün. Bei erfolgter Anlagerung von freigesetzten Cy5-markierten Oligos an Mitochondrien kommt es zur Kolokalisation, die gelb erscheint.

Lagen die Cy5-markierten Oligos intrazellulär noch in Kapseln vor, erschienen sie in CLSM-Aufnahmen als punktförmige, rot gefärbte Objekte. Dabei ist allerdings anzunehmen, dass sich die Kapseln selbst wiederum in Endosomen befanden. Das Kapselmateriale fluoreszierte nicht, wodurch „leere“ Kapseln, die alle Oligos freigesetzt hatten, kein Fluoreszenzsignal erzeugten. Fluoreszenz-markierte Mitochondrien wurden als fädige Strukturen grün abgebildet. Kam es durch die Anlagerung von freigesetzten Oligos an Mitochondrien zur Kollokalisierung, so erschienen die Mitochondrien gelb.

Bevor die Kinetikstudie diskutiert wird, soll zunächst gezeigt werden, dass eine Freisetzung der Oligos in manchen Zelllinien schon sehr früh erfolgte. Bereits nach 2 h zeigten alle Zelllinien eine Aufnahme der Nanokapseln (Abbildung 29) bzw. auch eine teilweise Freisetzung der Cy5-markierten Oligonukleotide. Eine Freisetzung ist, wie bereits im vorigen Abschnitt angesprochen, daran zu erkennen, dass die fädigen Strukturen der Mitochondrien durch die Oligos angefärbt wurden.

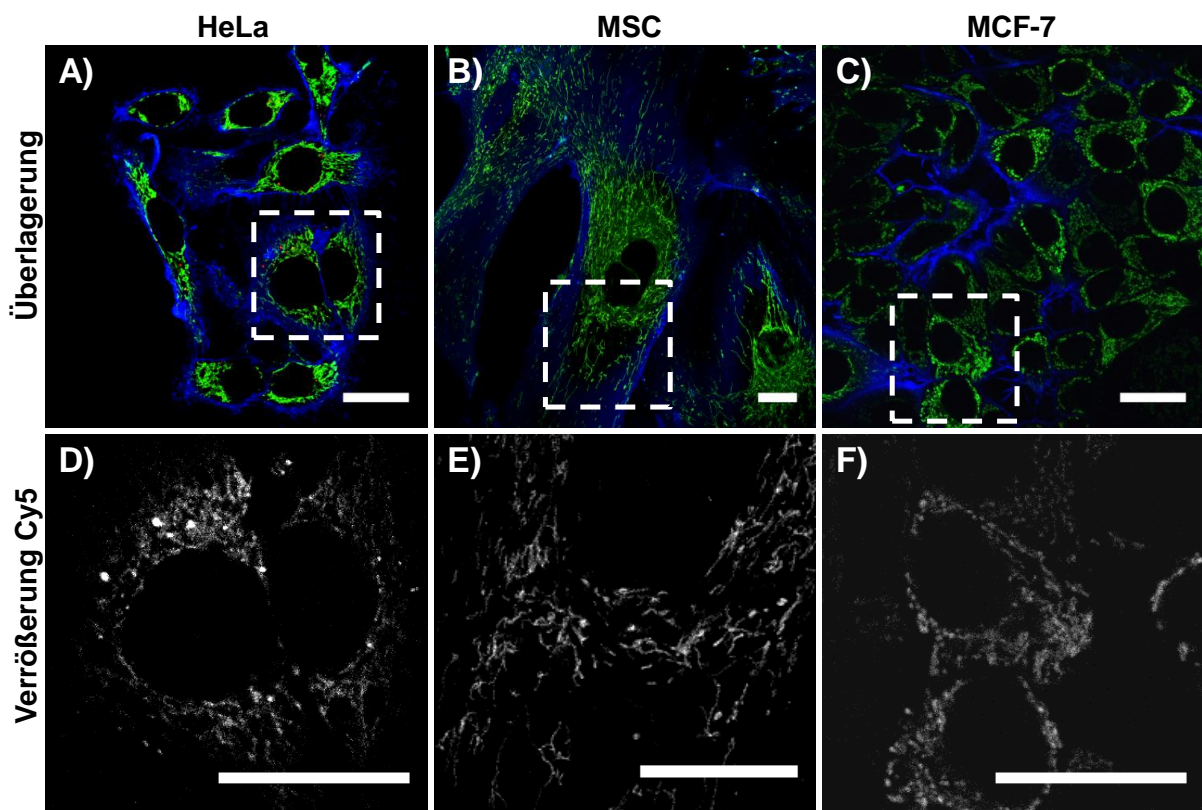


Abbildung 29: CLSM-Aufnahmen nach 2 h Inkubationszeit aller Zelllinien als Überlagerungsbild aller Fluoreszenzkanäle (A-C)) sowie einer Vergrößerung eines Ausschnitts des entsprechenden Überlagerungsbildes (D-F)) in schwarz/weiß. Das weiße Signal gibt nur das Fluoreszenzsignal von Cy5 wieder. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Die Zelllinie HeLa wies am besten definierte Cy5-Signale als Fluoreszenz-Spots auf (Abbildung 29, D)), was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um Cy5-Oligos handelt, die noch nicht frei gesetzt wurden. MSC und MCF-7 sind hauptsächlich durch bereits freigesetzte Cy5-Oligos gekennzeichnet, was allerdings nur als sehr schwaches Signal zu erkennen ist. Deshalb wurde in der Vergrößerung der Aufnahmen (Abbildung 29, D)-F)) das Cy5-Signal weiß abgebildet, um den bestmöglichen Kontrast auf schwarzem Hintergrund zu erreichen. Dass es sich hierbei um mögliche anhaftende Oligos handelte, die nicht verkapselt wurden, kann ausgeschlossen werden aufgrund vorangegangener Versuche von Dr. Steffen Lorenz, der Überstandsmessungen abzentrifugierter Kapseldispersionen hinsichtlich Fluoreszenz untersuchte und im Überstand keine Cy5-Signale detektieren konnte.<sup>29</sup> Ein möglicher Grund für diesen Unterschied in der Freisetzung der Oligos könnten unterschiedliche Konzentrationen an endosomalen Enzymen (z. B. Esterasen) in den untersuchten Zelllinien sein, wodurch die Kapseln unterschiedlich schnell abgebaut wurden. Der Abbau der Kapseln wurde bereits in Kapitel 2.5 angesprochen, soll aber im nächsten Abschnitt noch einmal genauer beschrieben werden. Zunächst wird aber auf die Kinetikstudie eingegangen, welche in Abbildung 30 als Überlagerungsbilder aller Fluoreszenzkanäle dargestellt ist.

Zwischen 2 und 48 h stieg die Kolokalisation zwischen Cy5-markierten Oligos und angefärbten Mitochondrien. Das heißt, dass sich immer mehr Oligos an die Mitochondrien anlagerten, wodurch sich das Cy5-Signal und das Signal von MitoTracker® Green FM an der gleichen Position in der Zelle bzw. in der CLSM-Aufnahme befand, d. h. kolokalisierte. Nach einer Inkubationszeit von 5 h (Abbildung 30, D) und E)) wiesen sowohl HeLa-Zellen als auch MSCs einen viel höheren Kolokalisationsgrad auf als nach 2 h (Abbildung 30, A) und B)), was auf eine schnelle Freisetzung der Oligos rückschließen lässt. Jedoch hatten MCF-7 nach der gleichen Inkubationszeit vergleichsweise wenig Nanokapseln aufgenommen, obwohl die gleichen Versuchsbedingungen eingehalten wurden wie auch für HeLa-Zellen oder MSCs.



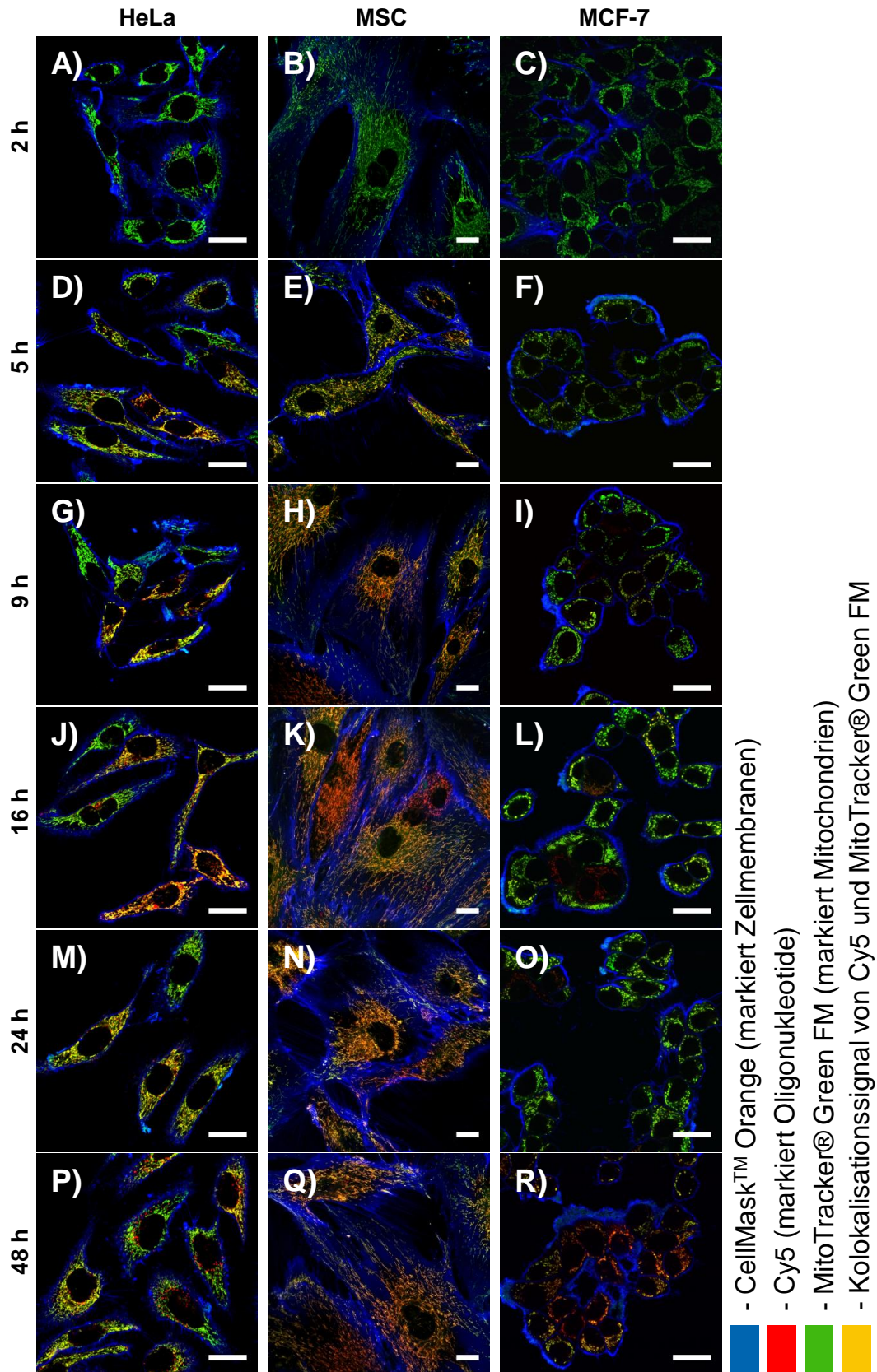
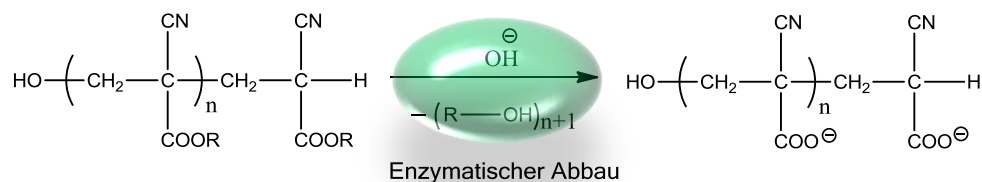


Abbildung 30: CLSM-Aufnahmen von NK1 in HeLa-Zellen (erste Spalte A-P)), MSCs (zweite Spalte, B-Q)) und MCF-7 (dritte Spalte C-R)). Sowohl die Aufnahme der Nanokapseln als auch die Freisetzung der Oligos ist nach einer Inkubationszeit von 2-48 h gezeigt. Je länger die Inkubation andauerte, desto mehr stieg die Kolokalisation der Fluoreszenzsignale von Cy5-markierten Oligos und angefärbten Mitochondrien in allen drei Zelllinien an. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

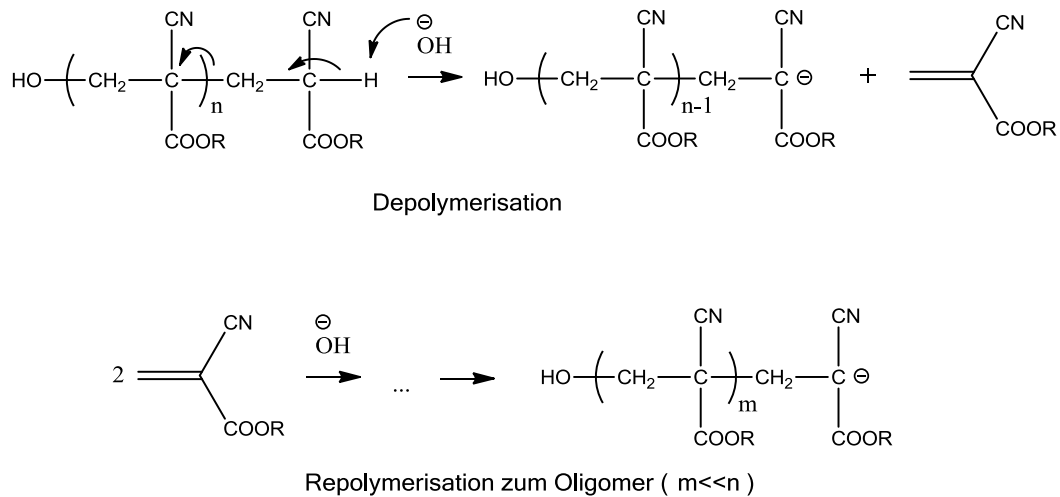
Die Analyse der Zelllinie HeLa erwies sich allerdings als Herausforderung, da neben Zellen, die einen hohen Grad an Kolo-kalisation (rein optisch) aufwiesen, Zellpopulationen auftraten, in denen nahezu keine Kolo-kalisation detektiert werden konnte (Abbildung 30, A-P)). In diesen Zellen wurden nur Signale runder Strukturen erfasst, welche auf Endosomen bzw. Lysosomen hinweisen, die die Kapseln enthielten, welche die Oligos noch nicht freigesetzt hatten. Solche „intakten“ Kapseln waren vorwiegend in HeLa-Zellen zu finden, wobei die Menge dieser Kapseln mit zunehmender Inkubationszeit anstieg, was darauf hinweist, dass auch immer mehr Kapseln aufgenommen wurden im Verlauf der gesamten Kinetik. MSCs und MCF-7-Zellen zeigten schon nach der ersten Inkubationszeit von 2 h fast ausschließlich freigesetzte Oligos und wiesen nahezu keine „intakte“ Kapselstruktur mehr auf. Auch dieses unterschiedliche Verhalten in Kapselaufnahme bzw. Oligofreisetzung könnte ein Hinweis auf Zelltyp-spezifische Enzymkonzentrationen sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass hauptsächlich Esterasen für den Abbau von PBCA verantwortlich sind. Scherer *et al.* berichteten, dass vor allem proteolytische Esterasen die Stabilität von PBCA *in vitro* beeinflussen im Vergleich zu anderen Enzymen wie Amylase oder Pepsin.<sup>182</sup> Der Abbau polymerer Alkylcyanacrylate kann enzymatisch oder hydrolytisch bei  $\text{pH} < 7$  erfolgen.<sup>183</sup> Dieser Abbau der Seitenkette ist schematisch in Abbildung 31 dargestellt. Als Abbauprodukte entstehen Poly(cyanacrylsäure) und ein primärer Alkohol. Im Falle von PBCA entsteht als primärer Alkohol *n*-Butanol.



**Abbildung 31: Enzymatischer Abbau von Poly(alkylcyanacrylaten) durch Esterasen. Als Abbauprodukte entstehen Poly(cyanacrylsäure) und ein primärer Alkohol. Modifiziert nach.<sup>183</sup>**

Neben diesem Hauptmechanismus zum Abbau von PBCA ist auch ein anderer Mechanismus denkbar, welcher auf der Grundlage einer Depolymerisation mit anschließender Repolymerisation basiert und innerhalb von Sekunden abläuft. Dieser Mechanismus wurde von Ryan *et al.* beschrieben.<sup>184</sup> Wie schematisch in Abbildung 32 zu erkennen ist, erfolgt zunächst eine baseninduzierte Depolymerisation.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung des Abbaus von Poly(alkylcyanoacrylaten) via Depolymerisations-Repolymerisations-Mechanismus. Modifiziert nach.<sup>26, 184</sup>**

Der Abstraktion des terminalen Protons folgt eine Repolymerisation, die ebenfalls baseninduziert ist, wodurch Oligomere mit geringerem Molekulargewicht entstehen als diejenigen, die nach der Depolymerisation entstanden sind. Ein weiterer Mechanismus, welcher Formaldehyd und Cyanessigsäure als Abbauprodukte zur Folge hat, wird ebenfalls in der Literatur diskutiert.<sup>185</sup> Doch Lenaerts *et al.* zeigte, dass diese inverse Knoevenagel-Reaktion sehr langsam im Vergleich zum enzymatischen Abbau ist.<sup>183</sup>

Der Einfluss des pH-Wertes auf den Abbau von Poly(alkylcyanoacrylaten) wurde im Detail von Scherer *et al.* untersucht.<sup>182</sup> Dabei wurde festgestellt, dass sich die Abbaurrate erhöht, wenn der pH-Wert aufgrund einer höheren Hydroxylionen-Konzentration ansteigt, da hierbei verstärkt hydrophile Angriffe erfolgen können. Nach der zellulären Aufnahme der PBCA-Nanokapseln über Endozytose wird der pH-Wert jedoch immer mehr herabgesetzt auf dem Weg von frühen Endosomen bis hin zu Lysosomen (Vergleich Kapitel 2.4). Aus diesem Grund kann der Einfluss des pH-Wertes für die Betrachtungen des Abbaus von PBCA in dieser Arbeit außer Acht gelassen werden.

Eine nachfolgende quantitative Analyse der CLSM-Aufnahmen hinsichtlich Kolo-kalisation wurde vorgenommen, um weitere Aussagen zur Zelltyp-spezifischen Freisetzung der Oligonukleotide sowie zum generellen Aufnahmeverhalten der Zellen treffen zu können.

### 5.1.3 Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®

Um die optischen Eindrücke aus Kapitel 5.1.2 untermauern zu können und vor allem auch um quantitative Aussagen zu erhalten, wurden die CLSM-Aufnahmen der Kinetikstudie hinsichtlich verschiedener Kolokalisationskoeffizienten ausgewertet. Dafür wurde das Programm Volocity® genutzt, welches auf die Rohdaten der Aufnahmen zurückgreift und so veränderte Fluoreszenzintensitäten aufgrund von Bildbearbeitung außer Acht lässt. Der Grad der Kolokalisation wurde anhand der Kolokalisationskoeffizienten „Manders' Coefficients“ M1 und M2 bestimmt. Die Manders-Koeffizienten sind laut Barlow *et al.*<sup>164</sup> biologisch bedeutender als der Kolokalisationskoeffizient nach Pearson (Pearson's Correlation Coefficient, PCC), da gerade bei biologischen Proben mit Unterschieden bzw. Schwankungen innerhalb der Fluoreszenzintensitäten der kolokalisierenden Fluorophore (v. a. bei Kinetikstudien) gerechnet werden muss. Gegenüber solchen Unterschieden bzw. Schwankungen ist der PCC sehr anfällig, obwohl dieser immer wieder als Standardwert für die Beschreibung von Kolokalisation verwendet wird. Details zur Auswertung hinsichtlich der Kolokalisationskoeffizienten sind Kapitel 3.4 zu entnehmen.

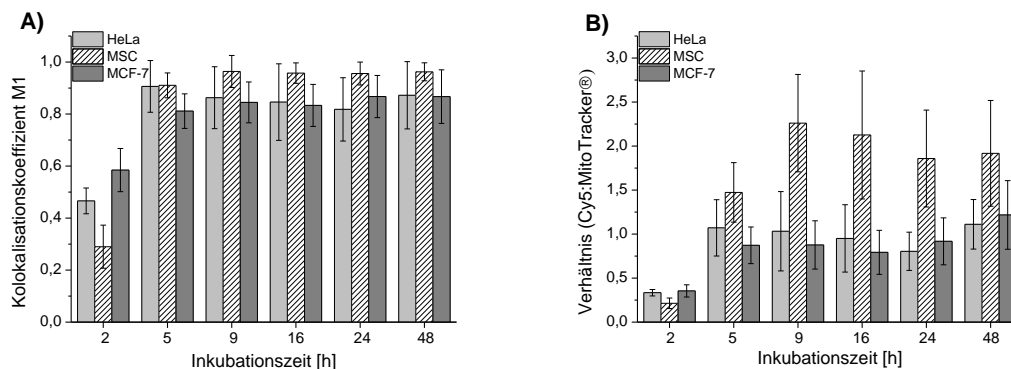
Der Kolokalisationskoeffizient M1 bezieht sich auf die Fluoreszenzsignale des MitoTrackers® und beschreibt die Menge an Pixeln dieses Fluorophors, die mit den Pixeln von Cy5 kolokalisierten. Bei dieser Art von Quantifizierung wurde davon ausgegangen, dass das Signal des MitoTrackers® immer konstant blieb, da nach jeder Inkubationszeit immer die gleiche Methode zum Anfärben der Mitochondrien eingesetzt wurde. Lediglich das Signal von Cy5 änderte sich über die Inkubationszeit hinweg. Deswegen wurde auch hauptsächlich der Kolokalisationskoeffizient M1 ausgewertet. Die Auswertung von M2 wurde nur in einigen Fällen verwendet, da dieser Koeffizient nur ins Gewicht fällt, wenn sich auch die Fluoreszenzsignale von MitoTracker® über die Inkubationszeit verändern.

Abbildung 33 A) zeigt die Quantifizierung der Kolokalisation basierend auf der Analyse von M1 in jeder Zelllinie für jede Inkubationszeit. Jeder abgebildete Wert wurde aus 30-50 analysierten Einzelzellen ermittelt. Alle Zelllinien wiesen einen Anstieg in der Kolokalisation auf. Der Kolokalisationsgrad schien nach 5 h Inkubationszeit sein Maximum erreicht zu haben und blieb auch nach längeren Inkubationszeiten konstant. Ein M1-Wert nahe 1 bedeutet, dass vollständige Kolokalisation vorliegt. Das heißt, dass in den Zellen, die Kolokalisation aufwiesen, die Oligos vollständig an Mitochondrien akkumuliert haben müssen und sich nicht an andere Organellen anlagerten bzw. sich frei im Zytosol befanden. Das heißt aber auch, dass die Oligos auf jeden Fall aus den Kapseln freigesetzt wurden. Die ermittelten Werte für M1 lagen bei der Zelllinie MSC dem Wert 1 am nächsten. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass in MSCs die Freisetzung der Cy5-Oligos am

effektivsten erfolgte, was durch die CLSM-Aufnahmen aus Abbildung 30 auch bestätigt werden kann.

Der optische Eindruck der Kolokalisation weicht leicht von den berechneten Werten ab. Allerdings muss natürlich berücksichtigt werden, dass bei der quantitativen Auswertung ein Vielfaches der Zellen analysiert wurde, die auf den CLSM-Aufnahmen aus Abbildung 30 zu sehen sind.

Allerdings kann mit Hilfe der berechneten Kolokalisationskoeffizienten keine Aussage über das unterschiedliche Aufnahmeverhalten einer speziellen Zelllinie wie HeLa getroffen werden. Ein möglicher Weg, um die Aufnahmekinetik genauer analysieren zu können, war die Berechnung des Verhältnisses der Pixel, die die Cy5-Signale generierten und der Pixel, die durch MitoTracker® entstanden. Es wurde angenommen, dass die Anzahl der MitoTracker®-Signale über die Dauer der Beobachtungszeit hinweg konstant geblieben ist (konstante Probenpräparation), was als Bezugspunkt für eine Normierung des Cy5-Signals verwendet werden konnte. Sollten die Zellen über die Inkubationszeit hinweg mehr Nanokapseln endozytieren, so würde das Verhältnis (Cy5:MitoTracker®) ansteigen. Diese Annahme wird in Abbildung 33, B) bestätigt. Es lässt sich erkennen, dass die Aufnahme über die Zeit in jeder Zelllinie anstieg und nach 9 h konstant blieb.

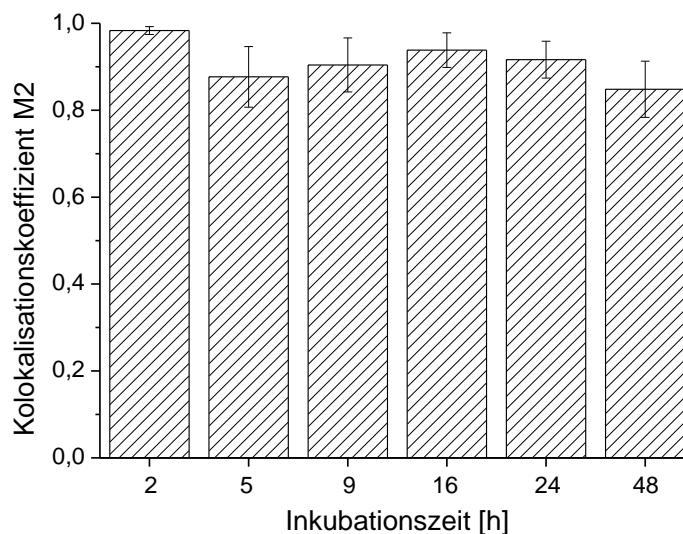


**Abbildung 33: Quantifizierung der Kolokalisation durch Berechnen des Kolokalisationskoeffizienten „Manders' Coefficient“ M1 (A)), welcher wiedergibt, wie viel und wie gut das Fluoreszenz-Signal von Cy5 mit dem MitoTracker®-Signal überlappt. Das Verhältnis (B)) der ermittelten Signale beider Farbstoffe beschreibt die Aufnahmekinetik in allen Zelllinien.**

Auch diese Werte wurden wieder aus dem Mittelwert von 30-50 Zellen gebildet. Es handelte sich dabei um die gleichen Zellen, die schon für das Ermitteln von M1 verwendet wurden. Der optische Eindruck, den man aus Abbildung 30 gewonnen hat, konnte mit Hilfe der Berechnungen bestätigt werden. Außerdem kann man erkennen, dass die Zelllinie MSC am

stärksten Cy5-Oligos bzw. Kapseln aufnahm aufgrund der höchsten Werte, die bei der Ermittlung des Verhältnisses erreicht wurden (Abbildung 33, B). Diese Tatsache könnte auf zellspezifische Eigenschaften zurückgeführt werden.

Wie bereits erwähnt, gibt M1 wieder, wie viel bzw. wie gut das Signal des MitoTrackers® mit dem Signal der Cy5-markierten Oligos überlappte bzw. kolokalisierte. Akkumulierten nur wenig freigesetzte Oligos mit den Mitochondrien, so würde der ermittelte Wert für M1 eher niedrig (Vergleich 3.4) sein. Ein besseres Verständnis darüber, ob sich alle freigesetzten Oligos tatsächlich an Mitochondrien anlagerten, gibt die Ermittlung von „Manders' Coefficient“ M2. Dabei kann man Aussagen darüber treffen, wie gut das Cy5-Signal mit MitoTracker® überlappte bzw. kolokalisierte. Ein M2-Wert nahe 1 müsste für alle Inkubationszeiten zu erwarten sein, wenn jegliche freigesetzte Oligos an Mitochondrien akkumulierten. Abbildung 34 veranschaulicht diesen Sachverhalt anhand der Zelllinie MCF-7, in welcher aus Abbildung 30 zu erkennen ist, dass kaum „intakte“ Kapseln vorlagen, die die Auswertung eventuell negativ beeinflussen könnten. Tatsächlich kann für jede Inkubationszeit ein M2-Wert nahe 1 ermittelt werden, wodurch die Theorie bestätigt werden kann, dass sich alle freigesetzten Oligos an Mitochondrien anlagerten.



**Abbildung 34:** Darstellung des Kokolisationskoeffizienten M2 der Zelllinie MCF-7, der wiedergibt, wie gut das Cy5-Signal mit Signalen von MitoTracker® überlappt bzw. kolokalisiert. Ein Koeffizient nahe 1 kann als vollständige Anlagerung aller freigesetzten Oligos an Mitochondrien interpretiert werden.

### 5.1.4 Einfluss der Kapselkonzentration auf das Aufnahmeverhalten in HeLa-Zellen

Neben der Inkubation der Zellen mit einer geringen Kapselkonzentration (75 µg/mL) wurden Versuche mit einer deutlich höheren **NK1**-Konzentration (300 µg/mL) durchgeführt, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob Unterschiede im Aufnahmeverhalten zu erkennen sind.

Eine höhere Aufnahmerate könnte Einfluss auf die weiterführende Umsetzung des endosomalen Inhalts (Kapseln) nehmen, da eine größere Anzahl an abbaubarem Material vorhanden wäre. Um diesen Versuch umzusetzen, wurden HeLa-Zellen 2 h mit 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **NK1** inkubiert und die CLSM-Aufnahmen mit denen verglichen, die mit 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durchgeführt wurden. Nach 2 h Inkubationszeit mit höherer Kapselkonzentration konnte rein visuell eine höhere Aufnahme festgestellt werden (Abbildung 35). Daneben wurde ebenfalls eine höhere Freisetzung der Oligos verzeichnet, verglichen mit der niedrigeren Konzentration, was deutlich an verstärktem Auftreten der roten fädigen Strukturen aus Abbildung 35, C) im Vergleich zu A) zu erkennen ist.

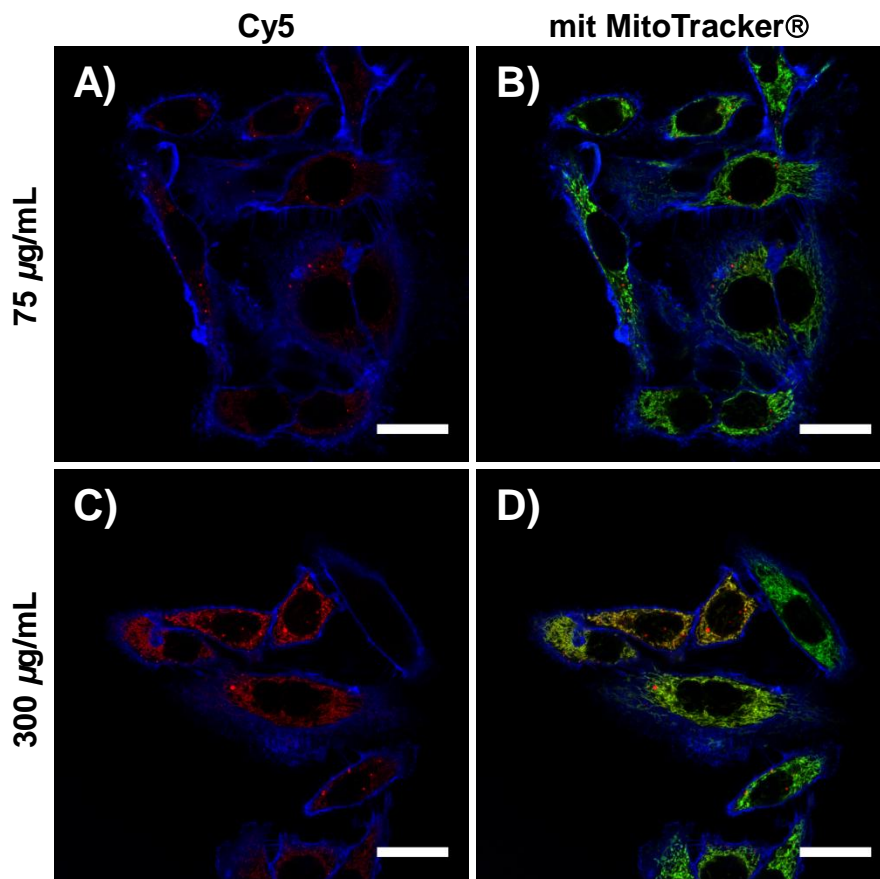


Abbildung 35: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen, die 2 h mit NK1 bei einer Konzentration von 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A, B) und von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (C, D) inkubiert wurden. Die Aufnahmen aus A) und C) zeigen die Cy5-markierten Oligos als rote Signale (blaue Signale markieren die Zellmembranen). In B) und D) erkennt man die Überlagerung der roten und blauen Signale mit dem MitoTracker®-Signal, welches grün dargestellt ist. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Auch in diesem Versuch konnten wieder, wie schon bei der Kinetikstudie, verschiedene Populationen an Zellen verzeichnet werden, d. h. Zellen mit einer hohen Anzahl an Cy5-Signalen neben Zellen mit nahezu keinem Cy5-Signal. Diese Unterschiede könnten die

Folge von Zellzyklus-abhängigen Vorgängen sein. Aufgrund der Komplexität der Versuche, die zur Aufklärung der Zellzyklusabhängigkeit hätten durchgeführt werden müssen, wurde dieser Punkt nicht weiter untersucht. Allerdings ist die Frage weiterhin interessant, ob die verschiedenen Zellpopulationen, die innerhalb eines CLSM-Bildes detektiert wurden, tatsächlich die Auswirkung unterschiedlicher Phasen des Zellzyklus sind. Im Allgemeinen kann ausgesagt werden, dass sich die Kapseln auch bei hohen Konzentrationen nicht selbst beeinflussten oder behinderten und die Freisetzung der Oligos auch bei hoher Aufnahme rate sehr schnell erfolgte.

In weiterführenden Versuchen wurde getestet, ob eine „Dauerinkubation“ der Zellen über 2 h mit hoher Kapselkonzentration und anschließender Entfernung der Kapseln unter Austausch mit frischem Medium einen Einfluss auf die Freisetzungskinetik hatte. MSCs und HeLa-Zellen wurden dafür 2 h mit 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **NK1** inkubiert, anschließend die Nanokapseln entfernt, die Zellen gewaschen und noch weitere 3 bzw. 7 h im Brutschrank mit frischem Medium inkubiert. Die Ergebnisse sind als CLSM-Aufnahmen in Abbildung 36 dargestellt.

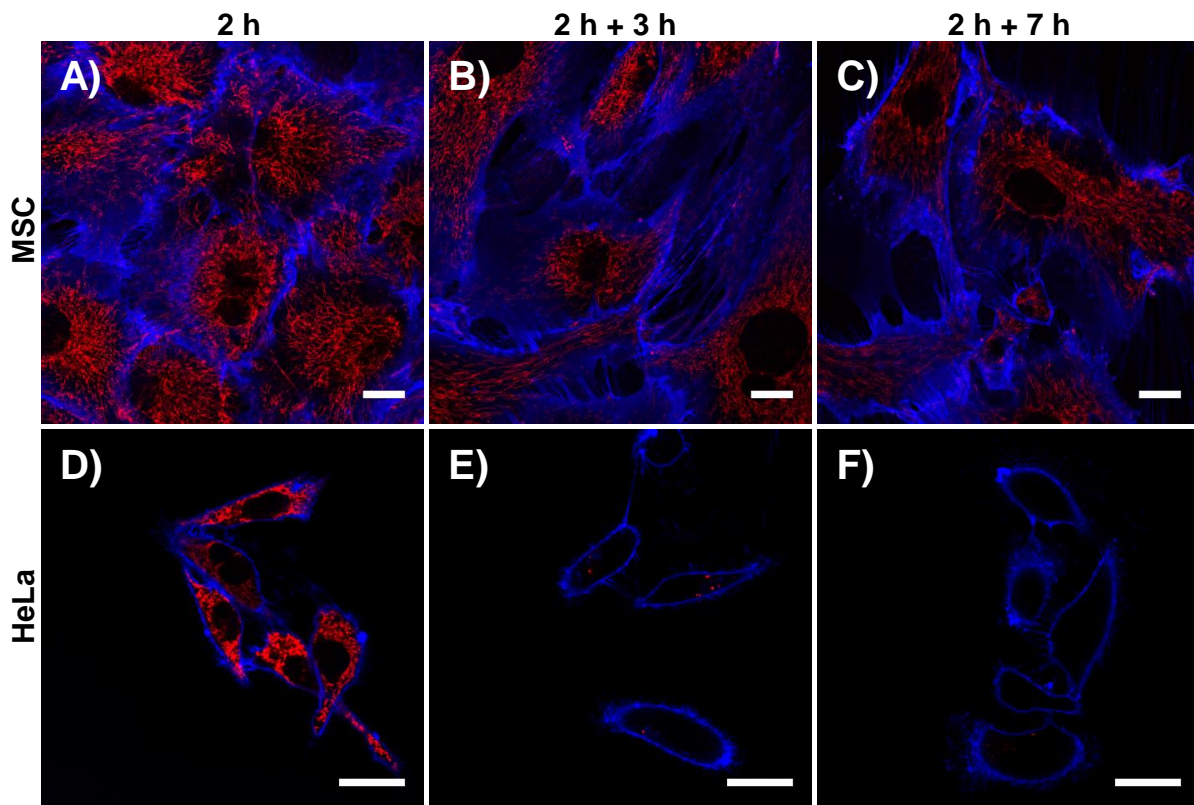


Abbildung 36: CLSM-Aufnahmen von MSCs (A) und HeLa-Zellen (D) nach 2 h Inkubation mit NK1 bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nach diesen 2 h „Dauerinkubation“ wurden die Nanokapseln entfernt, die Zellen gewaschen und weitere 3 bzw. 7 h in beiden Zelllinien inkubiert (B) und (C) für MSCs, (E) und (F) für HeLa-Zellen). Cy5-markierte Oligos sind rot, die Zellmembranen blau abgebildet. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .



Nach 2 h Inkubationszeit wiesen beide Zelllinien die gleichen fädigen Strukturen auf, die von Cy5-Oligos angefärbt wurden, wie es schon in Abbildung 35 für HeLa-Zellen gezeigt wurde. Es konnte eine starke Freisetzung der Oligonukleotide (Abbildung 36, A), D)) verzeichnet werden. Auf eine Darstellung der mit MitoTracker® angefärbten Mitochondrien wurde verzichtet, da in vorhergehenden Abschnitten nachgewiesen wurde, dass es sich bei den fädigen Strukturen, an welche die Oligos akkumulierten, um Mitochondrien handelte. Nach Entfernen der Nanokapseln, Waschen der Zellen und Inkubation mit frischem Medium für weitere 3 h konnte jedoch in HeLa-Zellen fast kein Signal der freigesetzten Oligos mehr detektiert werden (Abbildung 36, E)). Dahingegen wiesen MSCs nahezu keine Veränderung im Signal der Oligonukleotide auf (Abbildung 36, B), C)). Auch nach weiteren 7 h Inkubation mit frischem Medium, nachdem die Kapseln entfernt wurden, zeigte sich das gleiche Bild – HeLa-Zellen wiesen nahezu keine Signale der Oligos auf, in MSCs hingegen konnten die durch Cy5 markierten Oligos problemlos ohne Einbußen hinsichtlich Fluoreszenz-Intensität detektiert werden. Die Annahme liegt nahe, dass bei HeLa-Zellen eventuell die Exozytose der Oligos/Kapseln gefördert wurde, als frisches Medium nach Entfernen der überstehenden Kapsellösung dazugegeben wurde.

Weiterhin wurde auch nach insgesamt 24 bzw. 48 h Inkubationszeit (davon 2 h „Dauerinkubation“ mit anschließender Zugabe von frischem Medium) das Verhalten der Zellen hinsichtlich der eventuellen Exozytose der Oligos/Kapseln am CLSM untersucht. MSCs wiesen ein deutlich schwächeres Cy5-Signal auf als nach insgesamt 9 h Inkubationszeit. (Abbildung 37, A), B)), was auf der einen Seite durch verstärkte Exozytose begründet werden kann, allerdings auch aufgrund von Zellteilung eintreten kann, wenn man annimmt, dass gleich viele freigesetzte Oligos bzw. Kapseln auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wurden.

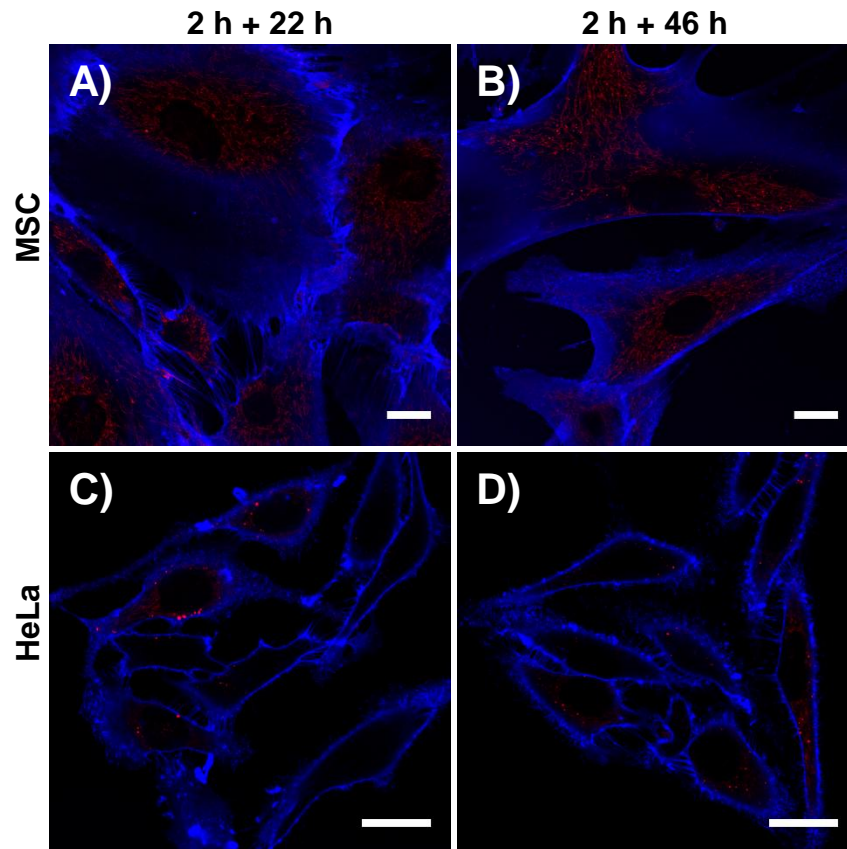
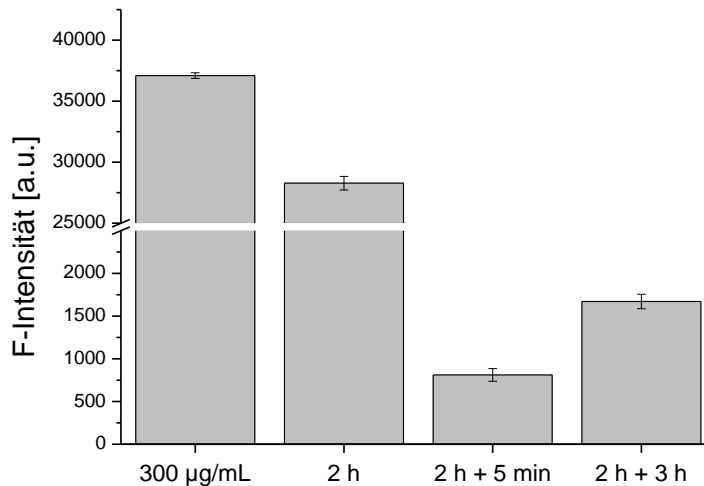


Abbildung 37: CLSM-Aufnahmen von MSCs (A, B) und HeLa-Zellen (C, D) nach 2 h „Dauerinkubation“ mit NK1 und anschließender weiterer Inkubation in frischem Medium für 22 und 46 h. Cy5-markierte Oligos sind rot, die Zellmembranen blau abgebildet. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Bei HeLa-Zellen hat es jedoch den Anschein, als ob nach 24 bzw. 48 h wieder mehr Kapseln zu detektieren waren mit teilweise Freisetzung der Oligos (Abbildung 37, C, D)). Dies könnte aus einer im Vergleich zur Exozytose wieder verstärkt einsetzenden Endozytose resultieren.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob bei HeLa-Zellen nach Entfernen der Kapsellösung und Folgeinkubation in frischem Medium tatsächlich eine Art „induzierte Exozytose“ vorlag, wurden Überstandsmessungen am Mikrotiterplattenleser durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und 2 h mit **NK1** bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inkubiert. Anschließend wurde die überstehende Kapsellösung entfernt und in frischem Medium weiterinkubiert. Die Messung erfolgte ebenfalls in 96-Well-Platten. Dabei wurden jeweils die Überstände (und nicht die Zellen selbst) hinsichtlich des Fluoreszenz-Signals der Cy5-Oligos nach 2 h Inkubation sowie nach 5 min und 3 h Folgeinkubation in frischem Medium untersucht. In Abbildung 38 ist die quantitative Erfassung der „induzierten Exozytose“ dargestellt. Alle Werte stellen den Mittelwert aus 10 Messungen dar. Um einen Vergleichswert zu haben, wurde auch die Ausgangskonzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Medium gemessen. Dieser stellt den höchsten Wert dar und dient außerdem der Orientierung, wie

viel Kapseln nach 2 h Inkubation von den Zellen aufgenommen wurden. Diese Aufnahme kann durch die Bildung der Differenz aus dem Wert der Ausgangskonzentration und dem Wert der Überstandsmessung nach 2 h ermittelt werden



**Abbildung 38: Quantitative Erfassung einer eventuell „induzierten Exozytose“ in HeLa-Zellen, nachdem diese 2 h mit NK1 (300 µg/mL) inkubiert wurden. Gezeigt sind die am Mikrotiterplattenleser gemessenen Überstände direkt nach der Inkubation (2 h) bzw. nach Folgeinkubation mit frischem Medium (2 h + 5 min; 2 h + 3 h). Der erste Wert zeigt die Fluoreszenz-Intensität der Ausgangskonzentration ohne Inkubation in HeLa-Zellen. Alle Werte sind abzüglich der entsprechenden Negativkontrolle abgebildet.**

Der Fluoreszenz-Wert nach Folgeinkubation in frischem Medium nach 5 min ist zwar deutlich geringer als der Wert zuvor, was aber damit erklärt werden kann, dass hier diverse Waschschriffe erfolgten, wodurch viele Zellen auch abgestorben sein könnten. Generell ist aber die Tendenz zu erkennen, dass der Wert kurz nach Zugabe des frischen Mediums um einiges geringer ist als nach 3 h. Da alle Zellen gleich behandelt worden sind, kann man diesen Anstieg innerhalb der Fluoreszenz-Intensität nur damit begründen, dass Exozytose auftrat, wodurch sich wieder mehr Kapseln bzw. Cy5-Oligos im Überstand befanden. Ob sich diese Exozytose nur auf die Oligos bezieht oder auch auf die gesamte Kapsel wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Es soll jedoch erwähnt werden, dass das Auftreten von verstärkter Exozytose schon einmal innerhalb der Arbeitsgruppe beobachtet werden konnte. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl bei HeLa-Zellen als auch bei MSCs ein Trend der Exozytose vorlag, wenn ein Austausch des Inkubationsmediums mit frischem Medium erfolgte.<sup>186</sup> Weiterhin wurde schon von Panyam *et al.*<sup>187</sup> gezeigt, dass die Exozytose von Partikeln ein schneller, konzentrationsgetriebener Prozess ist, welcher unterdrückt werden kann, wenn Serum-freies Medium verwendet wurde, was vermutlich auf die fehlende Präsenz von im Serum

enthaltenem Albumin zurückzuführen war.<sup>188</sup> Der Grund dafür könnte sein, dass BSA (bovines Serumalbumin) vermehrt mit Proteinen wechselwirkt, die bei der Exozytose involviert sind.

### 5.1.5 Einfluss des mitochondrialen Membranpotentials auf die Akkumulation der Oligonukleotide an Mitochondrien

Bislang konnte nur beobachtet werden, dass die freigesetzten Oligos an Mitochondrien akkumulierten. Die Frage nach dem Grund blieb jedoch bestehen. Um dies aufzuklären, wurde auf die literaturbekannte Annahme zurückgegriffen, dass lipophile Kationen wie MitoTracker®-Farbstoffe (kommerziell erwerbliche Mitochondrien-Farbstoffe) aufgrund des hohen mitochondrialen Membranpotentials in Mitochondrien akkumulieren.<sup>14</sup> Diese elektrostatische Anziehung war auch die Triebkraft für MitoTracker® Green FM in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, die Mitochondrien anzufärben und könnte auch der Grund sein, weshalb Cy5-markierte Oligos ebenfalls diese Organellen anfärben. Die Strukturformeln beider Fluorophore, sowohl MitoTracker® Green FM als auch Cy5, sind in Abbildung 39 dargestellt. Beide verfügen über ein gut ausgeprägtes  $\pi$ -Elektronensystem, welches eine positive Ladung trägt: beide können als lipophile Kationen angesehen werden.

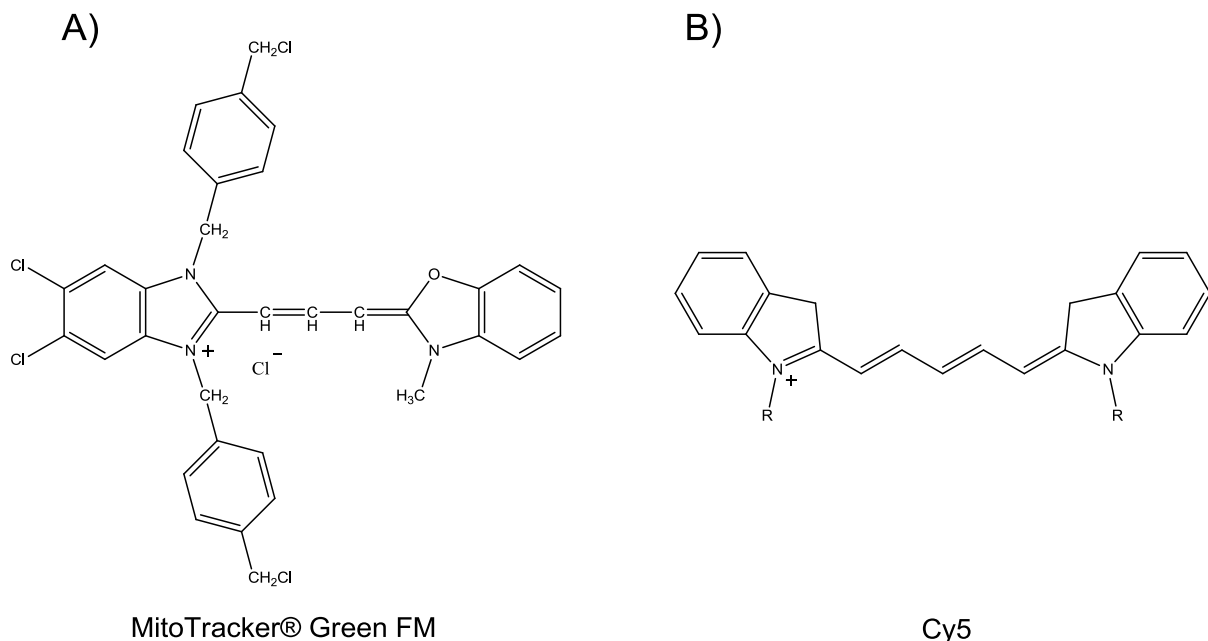


Abbildung 39: Chemische Strukturformeln von Mitotracker® Green FM (A)) und des Cyanin-Farbstoffes Cy5 (B)), welcher zur Markierung der Oligonukleotide verwendet wurde.

Wie in Kapitel 2.6.1 schon angedeutet wurde, sind Mitochondrien als Zielort für einen Wirkstoff von wachsendem Interesse in aktuellen Zellstudien.<sup>189</sup> Mitochondrien sind nicht nur für die Bereitstellung von ATP in Eukaryoten verantwortlich, sie sind außerdem bei wichtigen metabolischen Vorgängen wie der Oxidation von Fettsäuren, der Gluconeogenese oder des Zitratzyklus involviert<sup>139</sup> und spielen außerdem eine wichtige Rolle im Apoptosemechanismus.<sup>140</sup> Mitochondrien enthalten ihr eigenes Genom und weisen ein hohes Membranpotential von 180-200 mV auf.<sup>189</sup>

Rhee *et al.* konnte beweisen, dass das mitochondriale Membranpotential tatsächlich auch für die Anlagerung von Oligonukleotiden, die mit Cyanin-Farbstoffen markiert wurden, verantwortlich war.<sup>190</sup> Indem der Entkoppler Carbonylcyanin-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) in den Versuchen verwendet wurde, konnte das mitochondriale Membranpotential herabgesetzt werden, wodurch das Fluoreszenz-Signal der verwendeten Oligonukleotide geringer wurde und diffuse Fluoreszenz auftrat. Die Detektion erfolgte 1 h, nachdem die Zellen mit CCCP inkubiert wurden.<sup>190</sup> Allerdings wirkt ein Entkoppler schon viel früher – im Prinzip direkt nach der Zugabe auf lebende Zellen.<sup>148</sup>

Um den Effekt eines Entkopplers direkt nach Zugabe auf lebende Zellen aufzuzeigen, wurde eine Zeitstudie über 180 s am CLSM durchgeführt, in welcher Zellen beobachtet wurden, deren Mitochondrien gleichzeitig von MitoTracker® und Cy5-Oligos markiert wurden. Allerdings wurde statt CCCP das Ionophor Dinitrophenol (DNP) verwendet, welches in den 1930ern ein bekanntes Mittel war, um Adipositas zu behandeln. Dies liegt darin begründet, dass Entkoppler Protonophore sind, die das Ausströmen von Protonen durch die innere Mitochondrienmembran in die Matrix erhöhen, wodurch die oxidative Phosphorylierung herabgesetzt wird und als Folge davon die Oxidation von Fettsäuren ansteigt<sup>148</sup> (siehe dazu auch Abbildung 12 aus Kapitel 2.6.1). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde für die Durchführung des Versuchs die Zelllinie MSC gewählt, weil diese die beste und homogenste Kolokalisation aufwies. Nachdem MSCs 24 h mit **NK1** inkubiert und Mitochondrien mit MitoTracker® markiert wurden, erfolgte die Zugabe von DNP.

Zellen ohne DNP-Behandlung wiesen die charakteristische fädige Struktur der angefärbten Mitochondrien auf, welche sowohl mit MitoTracker® als auch mit Cy5-Oligos als definierte Fluoreszenzsignale über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg zu detektieren war (Abbildung 40, A-F)).

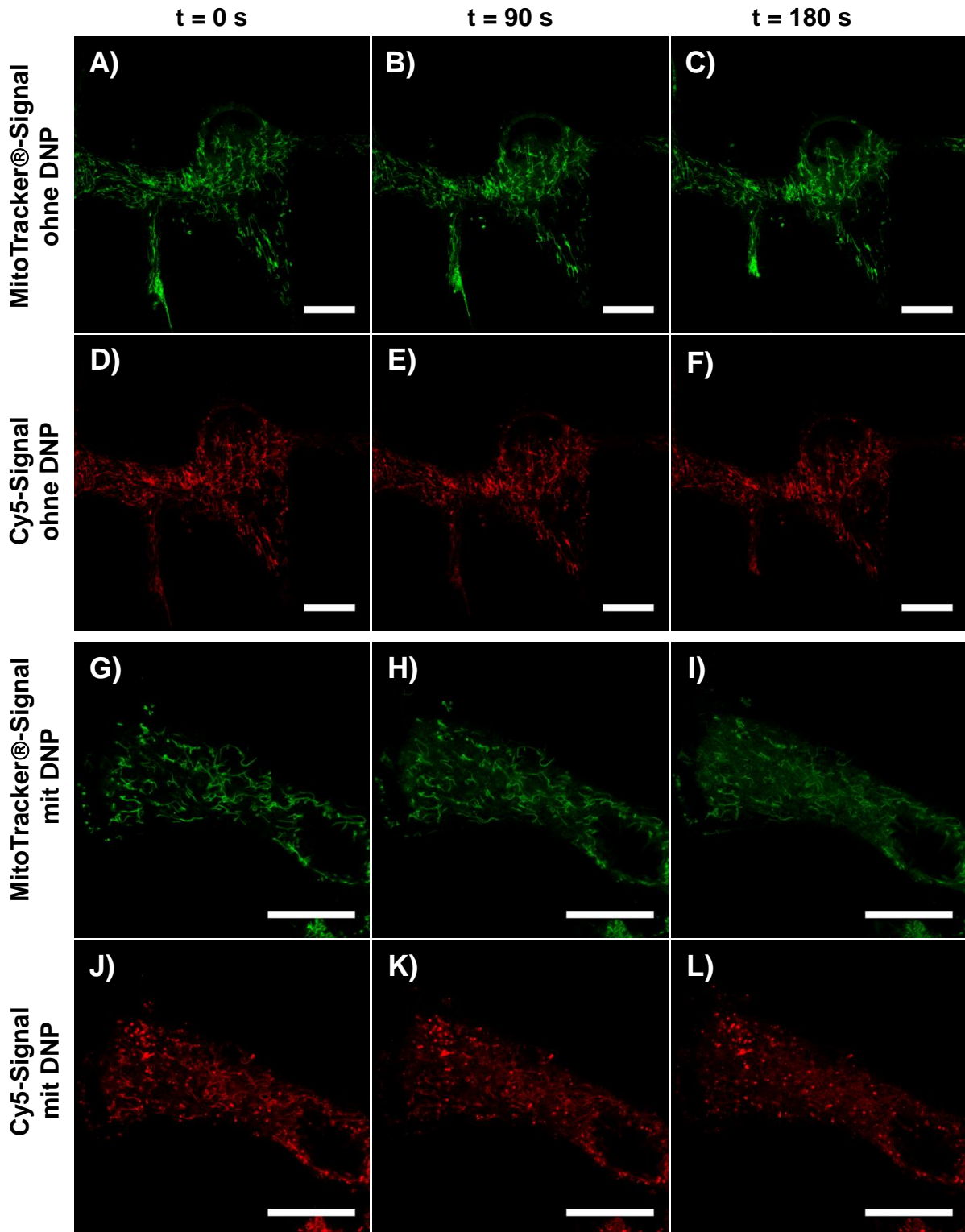


Abbildung 40: CLSM-Aufnahmen der Zeitstudie in MSCs über 180 s, die die Einwirkung von DNP auf MitoTracker® und Cy5-Oligos verdeutlicht. A)-F) zeigt den Versuch ohne DNP-Zugabe. Definierte Strukturen der angefärbten Mitochondrien konnten sowohl mit MitoTracker® als auch mit Cy5-Oligos detektiert werden. Wurde jedoch das mitochondriale Membranpotential durch DNP herabgesetzt, so ist die elektrostatische Anziehung von Membran und Farbstoffmolekül nicht mehr ausreichend, um die Mitochondrien definiert anzufärben. Das Fluoreszenz-Signal wurde zunehmend diffuser (G)-L)). Vor der Zugabe von DNP wurden die Zellen 24 h mit NK1 und anschließend mit MitoTracker® inkubiert. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Mit Hilfe dieser Negativkontrolle (Zellen ohne DNP-Behandlung) konnte auch gezeigt werden, dass keine Bleich-Effekte während der Beobachtungszeit von 180 s auftraten, da das Fluoreszenz-Signal beider Fluorophore gleich intensiv blieb (alle Aufnahmen wurden in gleicher Weise nachbearbeitet). Veränderungen in der Zellmorphologie sind auf Bewegungen der Zelle während der Aufnahme zurückzuführen. Wurde jedoch eine Probe mit DNP behandelt, die zuvor 24 h mit **NK1** und anschließend mit MitoTracker® inkubiert wurde, so zeigte sich im Verlauf der 180 s, dass beide Fluorophore (MitoTracker® und Cy5) die strukturellen Details der Mitochondrien nicht mehr wiedergaben und stattdessen diffuse Fluoreszenzsignale in der gesamten Zelle auftraten (Abbildung 40, G-L)).

Nachdem das mitochondriale Membranpotential durch die DNP-Einwirkung herabgesetzt wurde, verringerte sich die Anziehung und die angelagerten Fluorophore verteilten sich in der gesamten Zelle und waren nicht mehr nur an den Mitochondrien lokalisiert. Es konnte damit gezeigt werden, dass die elektrostatische Anziehung von Fluorophor und Mitochondrienmembran der Grund für die Akkumulation der Cy5-Oligos an die Mitochondrien ist. Im Falle der Cy5-Oligos konnten neben der diffusen Fluoreszenz auch noch definierte Fluoreszenz-Spots (rot) detektiert werden (Abbildung 40, L)). Da eine ähnliche Beobachtung bei MitoTracker® nicht gemacht werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass dies intakte Nanokapseln waren, die in Endosomen bzw. Lysosomen vorlagen und ihren Inhalt, d. h. die Cy5-Oligos, noch nicht freigesetzt hatten.

Aus Versuchen einer früheren Studie war bekannt, dass die Anlagerung der Cy5-Oligos an die Mitochondrien nicht sequenzabhängig war und nur die Kombination mit Cy5 diese Anlagerung hervorrief.<sup>181</sup> Für weiterführende Studien wäre also denkbar, dass man Fluorophore, die ähnliche Eigenschaften wie Cy5 aufweisen und an Mitochondrien akkumulieren, verwendet, um gezielt Mitochondrien zu erreichen. Dies könnte man sich auch im Bereich „Drug Delivery“ und „Gene Delivery“ zunutze machen. An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die Anlagerung von Cy5-Oligos an Mitochondrien nur dann stattfand, wenn das Fluorophor am 5'-Ende der Oligonukleotid-Sequenz gebunden war. Befand sich die Markierung am 3'-Ende konnte man nur Fluoreszenzsignale detektieren, die auf nicht freigesetzte Oligos hindeuteten (in Abbildung 41 als rote Fluoreszenzpunkte).

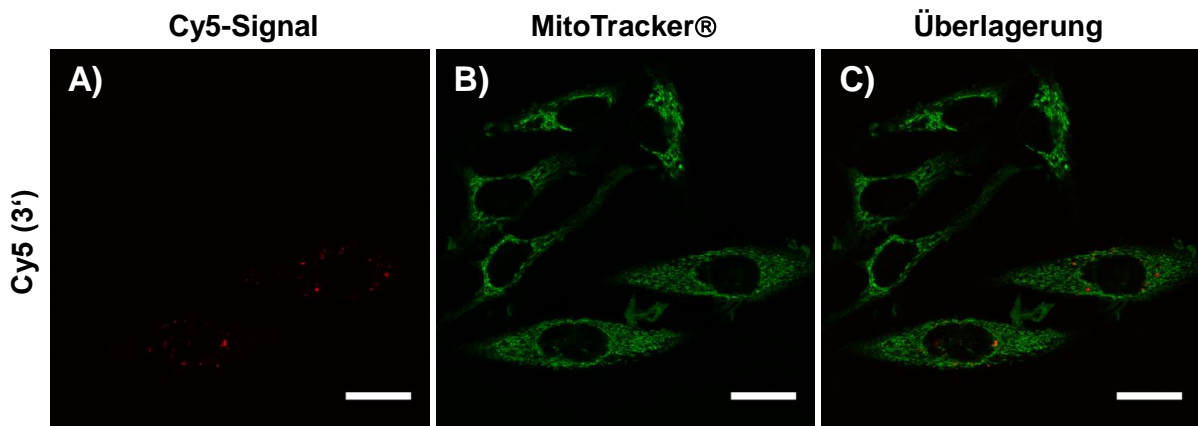


Abbildung 41: CLSM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Oligos (rot dargestellt), die am 3'-Ende mit Cy5 markiert wurden, zeigten keine Kolokalisation mit MitoTracker® (grün dargestellt). Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Wurde für die Markierung der gleichen Oligonukleotid-Sequenz der Cyanin-Farbstoff Cy3 verwendet, so konnten die gleichen Ergebnisse erzielt werden. So konnte ebenfalls Kolokalisation mit MitoTracker® und demzufolge eine Akkumulation der Oligos festgestellt werden, sobald Cy3 am 5'-Ende angebunden wurde (Abbildung 42).

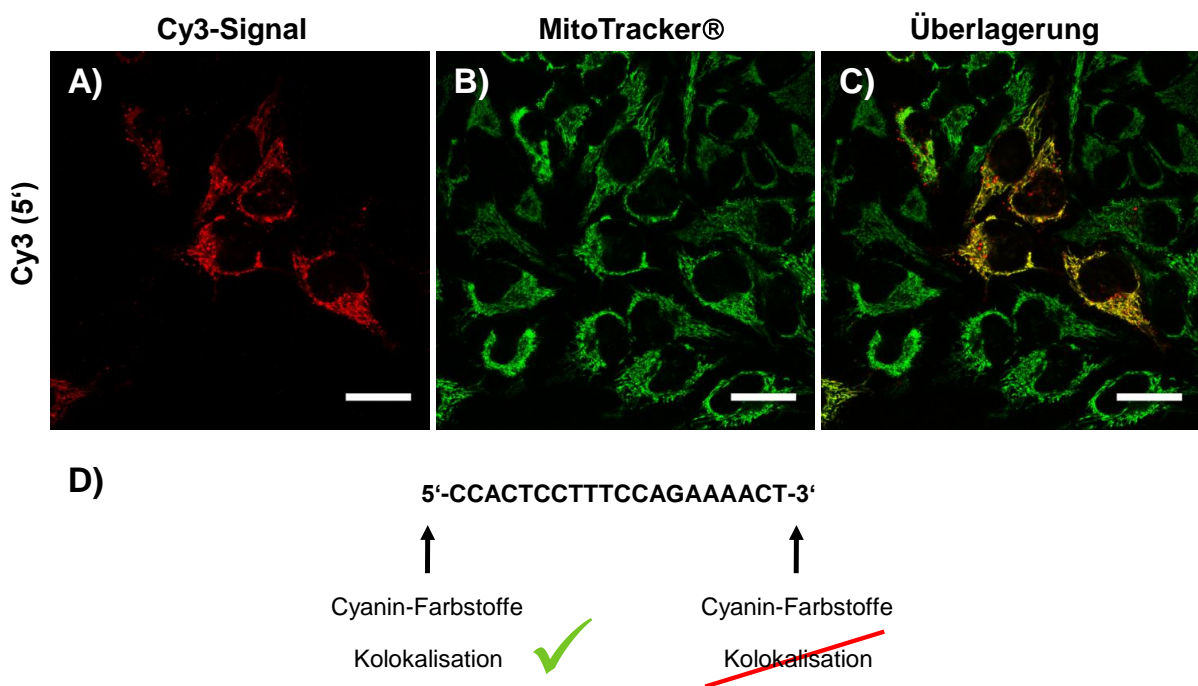
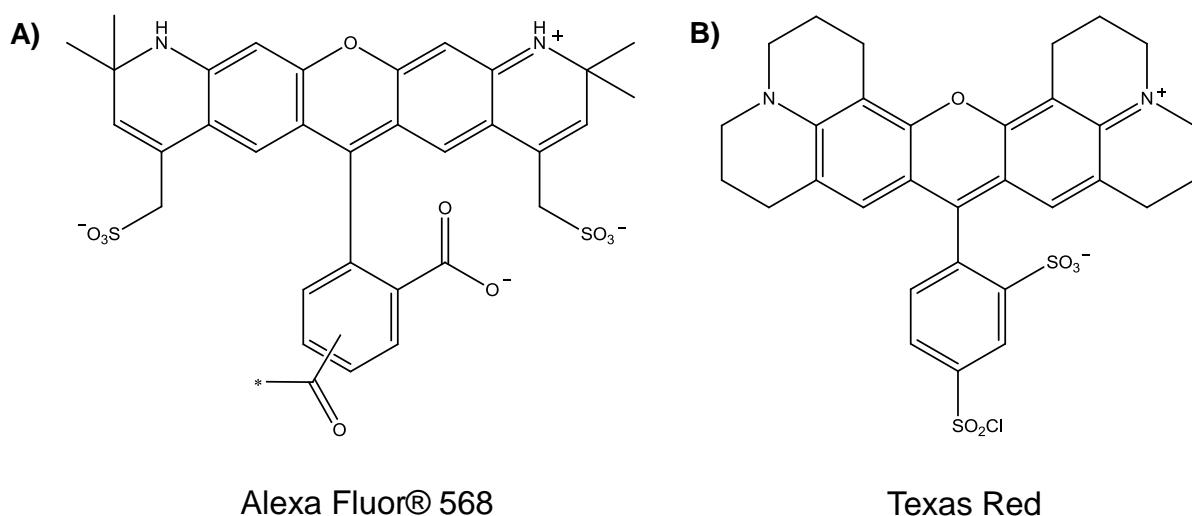


Abbildung 42: CLSM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen (A-C)). Oligos (rot dargestellt), die am 5'-Ende mit Cy3 markiert wurden, wiesen das gleiche Kolokalisationsverhalten auf, das bereits von Cy5-Oligos bekannt war. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ . D) Übersicht der verwendeten Oligos, die an verschiedenen Enden fluoreszent markiert wurden, wobei je nach Anbindungsstelle des Farbstoffs Kolokalisation mit MitoTracker® zu detektieren war.



Die Erkenntnis, dass die Position (5'- oder 3'-Ende der Sequenz) der Oligomarkierung entscheidend war, ob ein Kolokalisationsverhalten der Oligos beobachtet werden konnte oder nicht, war ausschlaggebend für weiterführende Versuche, die einen möglichen Abbau der Oligos aufklären sollten (siehe nachfolgendes Kapitel). Die Übersicht in Abbildung 42 D) fasst die gewonnenen Erkenntnisse zusammen.

Neben den bereits erwähnten und für den Fortgang dieser Studie relevanten Oligos, wurden auch noch Oligonukleotide hinsichtlich Anlagerung an Mitochondrien getestet, die mit anderen Farbstoffen markiert wurden. Dabei wurden die Farbstoffe Alexa Fluor® 555 und Texas Red<sup>29</sup> ebenfalls an das 5'-Ende der Oligos gebunden. In beiden Fällen konnte keine Anlagerung an Mitochondrien bzw. Kolokalisation mit MitoTracker® festgestellt werden. Dies zeigte wiederum die Notwendigkeit, den passenden Farbstoff an der geeigneten Position des Oligos anzubinden, um Kolokalisation detektieren zu können. Es scheint daher u. a. die Struktur des Farbstoffs ausschlaggebend zu sein, ob eine Akkumulation an Mitochondrien zu erwarten ist. Der Vollständigkeit halber sind in Abbildung 43 die Strukturformeln von Alexa Fluor® 555 bzw. Alexa Fluor® 568 und Texas Red abgebildet.



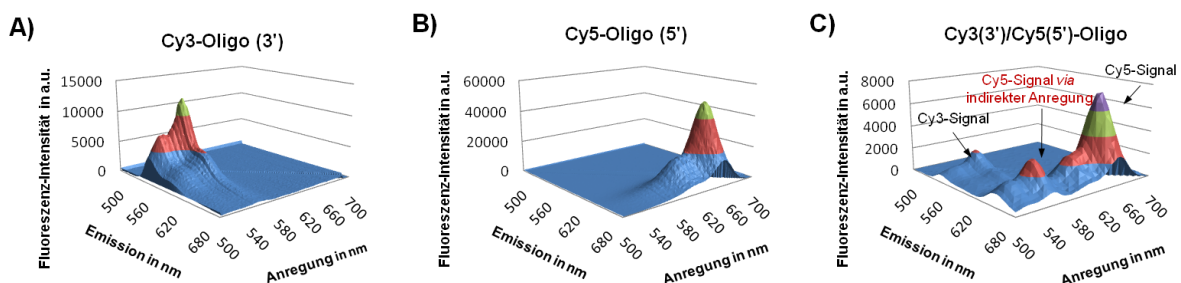
**Abbildung 43: Strukturformeln der Fluorophore Alexa Fluor® 568 (A)) stellvertretend für Alexa Fluor® 555 und Texas Red (B)).**

Als mögliche Begründung, warum diese Strukturen in Kombination mit den Oligos keine Kolokalisation aufwiesen, kann das Vorhandensein einer intramolekularen Ausgleichladung angeführt werden, wodurch das Molekül nach außen hin neutral (Texas Red) oder negativ (Alexa Fluor) geladen ist und nicht positiv wie lipophile Kationen. Das heißt, diese Moleküle stellen nicht wie MitoTracker® oder die Cyanin-Farbstoffe lipophile Kationen dar, werden

deshalb auch nicht vom mitochondrialen Membranpotential elektrostatisch angezogen und akkumulieren somit nicht an Mitochondrien.

### 5.1.6 Analyse zum Abbau der Oligonukleotide

Bisher konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotide aus PBCA-Nanokapseln freigesetzt wurden, an Mitochondrien akkumulierten und sich diese Freisetzung steigern ließ, wenn länger inkubiert wurde. Um Oligos freizusetzen, mussten Kapseln intrazellulär abgebaut werden. In diesem Zusammenhang kam die Frage auf, ob eventuell auch die Oligonukleotide selbst abgebaut wurden, nachdem sie aus den PBCA-Nanokapseln freigesetzt wurden. Es ist möglich, dass man aufgrund des Oligo-Abbaus nur den Farbstoff selbst detektiert, der sich an die Mitochondrien anlagert. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde das FRET-Paar Cy3/Cy5 verwendet. Die Voraussetzungen der spektralen Überlappung und der räumlichen Nähe (Förster-Radius) der Fluorophore wurden durch die Wahl dieses FRET-Paares und den Versuchsaufbau erfüllt. Die bekannte Sequenz aus den vorangegangenen Versuchen wurde an beiden Enden markiert. Dabei wurde Cy3 am 3'-Ende und Cy5 am 5'-Ende kovalent angebunden. Neben diesem doppelt markierten Oligo wurden auch Oligos untersucht, die nur einfach markiert waren, um zunächst Studien durchzuführen, die Aufschluss darüber geben sollten, ob der FRET-Effekt nachzuweisen ist. Die nicht verkapselten Oligos wurden dafür in der gleichen Konzentration, die auch in den Kapseln vorlag, *via* 3D-Scans am Mikrotiterplattenleser untersucht. Hierbei wurde sowohl die Anregung als auch die Emission (Fluoreszenz) in einem Bereich von 500-700 nm detektiert. Die Scans der einfach markierten Oligos (Abbildung 44, A), B)) zeigten dabei die Fluoreszenz, die durch direkte Anregung der Fluorophore hervorgerufen wurde.



**Abbildung 44:** 3D-Scans der einfach markierten Oligonukleotide (A) und B)) und des doppelt markierten Oligonukleotids, welches FRET-Eigenschaften aufwies. Sowohl Anregung als auch die Emission (Fluoreszenz) wurden in einem Bereich von 500-700 nm detektiert. Die Spektren aus A) und B) resultierten aus der direkten Anregung des Fluorophors. In C) ist deutlich der FRET-Effekt zu erkennen, da das Cy3-Signal deutlich verringert ist und zusätzlich ein Peak von Cy5 erscheint, der durch die indirekte Anregung aus der Emission von Cy3 resultierte.

Die Emissionsmaxima lagen dabei bei 570 nm für Cy3 und 670 nm für Cy5. Vergleicht man die Emissionsmaxima der einfach markierten Oligos mit dem Scan des doppelt markierten Oligos (Abbildung 44, C)), so wird deutlich, dass das Signal von Cy3 sehr stark abgeschwächt ist und ein zusätzliches Emissionsmaximum im Emissionsbereich von Cy5 (670 nm) erscheint. Dieses zusätzliche Maximum wurde durch den FRET-Effekt erzeugt, indem die Emission von Cy3 als Donor für die Anregung von Cy5 als Akzeptor verwendet wurde. Aus diesem Grund war auch die Emission von Cy3 kaum mehr zu detektieren. Es konnte also bewiesen werden, dass der FRET-Effekt im System Cy3/Cy5-Oligo auftritt, so dass weiterführende Zellstudien, die diesen Effekt auch in lebenden Zellen nachweisen sollten, angeschlossen werden konnten.

HeLa-Zellen wurden 24 h mit **NK2** inkubiert, die die doppelt markierten Oligos enthielten. Würde ein intrazellulärer Abbau der Oligos stattfinden, so befänden sich Donor (Cy3) und Akzeptor (Cy5) nicht mehr in räumlicher Nähe, der Förster-Radius würde nicht mehr gewährleistet sein und ein FRET-Effekt könnte nicht verzeichnet werden. Man würde zwei unterschiedliche Fluoreszenzsignale detektieren und nicht nur das des Akzeptors (Cy5). Beide Fluorophore wurden gleichzeitig detektiert, Cy3 bei  $\lambda(\text{em})=570\text{-}610$  nm sowie Cy5 bei  $\lambda(\text{em})=655\text{-}730$  nm. Zur Anregung wurde allerdings nur 1 Laserlinie verwendet. Wurde mit der Laserlinie  $\lambda(\text{ex})=561$  nm angeregt und beide Fluorophore gleichzeitig detektiert, so konnte nur ein schwaches Cy5-Signal (rot) erhalten werden (Abbildung 45, A)) aber kein Cy3-Signal, was darauf hinweist, dass der FRET-Effekt ebenfalls in lebenden HeLa-Zellen wirkt und die Oligos nicht abgebaut werden.

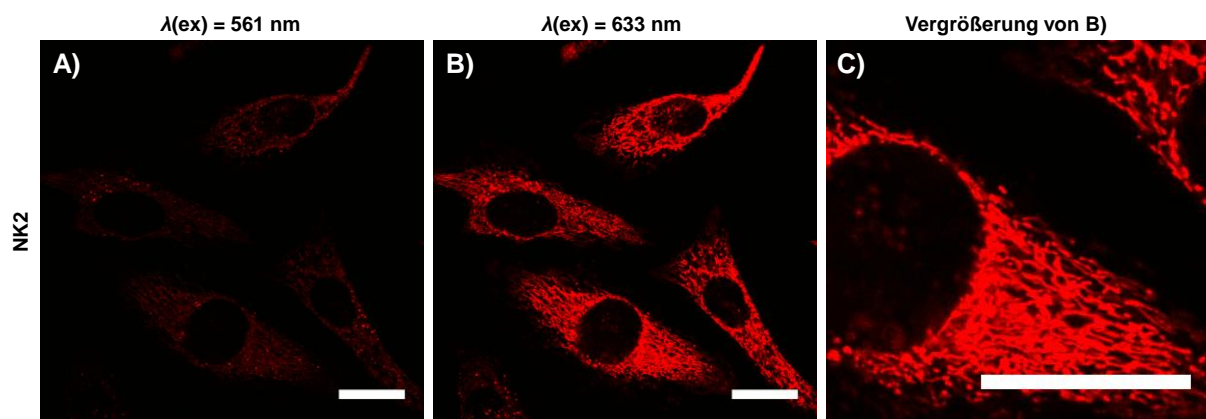


Abbildung 45: CLSM-Studien des FRET-Effekts in lebenden HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit NK2, welche doppelt markierte Oligos enthielten. Die Bilder wurden bei gleichzeitiger Detektion beider Fluorophore (Cy3, Cy5) aufgenommen, während allerdings nur 1 Laserlinie zur Anregung genutzt wurde. Wurde bei  $\lambda(\text{ex})=561$  nm angeregt (A)), sollten ausschließlich Cy3-Signale zu detektieren sein, die grün dargestellt werden würden. Aufgrund des FRET-Effekts erschienen nur sehr schwache Cy5-Signale, die rot dargestellt sind. Die gleiche Region wurde anschließend mit  $\lambda(\text{ex})=633$  nm angeregt, wodurch die gleichen Cy5-Signale mit höherer Intensität detektiert wurden. Die Vergrößerung unter C) weist deutlich die fädigen Strukturen von Mitochondrien auf. Der Größenbalken beträgt  $25 \mu\text{m}$ .

Das Cy3, das mit dieser Laserlinie eigentlich angeregt wurde, konnte nicht detektiert werden, da durch den FRET-Effekt dessen Emission für die Anregung von Cy5 aufgebraucht wurde. Als die gleiche Region mit der Laserlinie  $\lambda(\text{ex})=633$  nm angeregt wurde, erhielt man die gleichen Signale von Cy5, die deutlich die fädigen Strukturen der Mitochondrien wiedergaben (Abbildung 45, B, C)). Diese Signale sind deutlich stärker, da hier eine direkte Anregung von Cy5 erfolgte und eine viel größere Anregungs-Intensität zur Verfügung stand als bei der indirekten Anregung von Cy5 durch die Emission von Cy3.

An dieser Stelle soll noch einmal angemerkt werden, dass Oligonukleotide, die am 3'-Ende mit Cy3 (oder auch Cy5) markiert wurden, nicht an Mitochondrien akkumulierten. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass ein eventueller Abbau der doppelt markierten Oligos ebenfalls einen FRET-Effekt hervorrufen würde, da sich nicht beide Fragmente an Mitochondrien anlagern würden und sich deshalb auch nicht in räumlicher Nähe befänden.

Auf das zusätzliche Anfärben der Mitochondrien mit MitoTracker® Green FM wurde verzichtet, da mit dieser Studie der FRET-Effekt bzw. der Nachweis, dass die Oligos nicht abgebaut wurden, im Fokus stand und nicht die Kollokalisierung mit den Mitochondrien. Die fädigen Strukturen, die in Abbildung 45 zu erkennen sind, können allerdings mit Sicherheit den Mitochondrien zugeordnet werden, da dies schon aus vorhergehenden Versuchen hinreichend bewiesen wurde. Auf die Untersuchung der FRET-Effizienz wurde ebenfalls verzichtet, da CLSM-Aufnahmen qualitativ zeigen, dass die Cy3/Cy5-markierten Oligonukleotide nicht in der Zelle abgebaut werden, wodurch das Auftreten des FRET-Effekts einen hinreichenden Beweis für die vorhergehende Hypothese darstellt. Abschließend kann ausgesagt werden, dass in lebenden Zellen ebenfalls ein Energietransfer erfolgte, da ausschließlich die Emission des Akzeptors Cy5 detektiert wurde. Ein Abbau der Oligonukleotide in Zellen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

### 5.1.7 Intrazellulärer Verbleib von Kapselinhalt und Hüllmaterial

Bislang wurde der Verbleib des Kapselinhaltes, d. h. der markierten Oligos, innerhalb von Zellen untersucht. Jedoch konnte noch nicht gezeigt werden, wie sich die Kapselhülle selbst verhält – lagert sich die polymere Hülle ebenfalls an Mitochondrien an oder akkumuliert sie woanders? Um dies aufzuklären, wurde an PBCA-Nanokapseln mittels „Click-Chemie“ TAMRA angebunden, wodurch die Kapselhülle ebenfalls Fluoreszenz-markiert war. Um ein Anklicken zu ermöglichen, wurden Kapseln aus BCA und PCA (Propargylcyanacrylat) als Comonomer hergestellt. Das folgende Schema in Abbildung 46 stellt die „Click-Reaktion“ dar. Die Dreifachbindung der Propargylseitenkette auf der Oberfläche der Kapseln reagiert mit dem Azid des TAMRA-Farbstoffes.

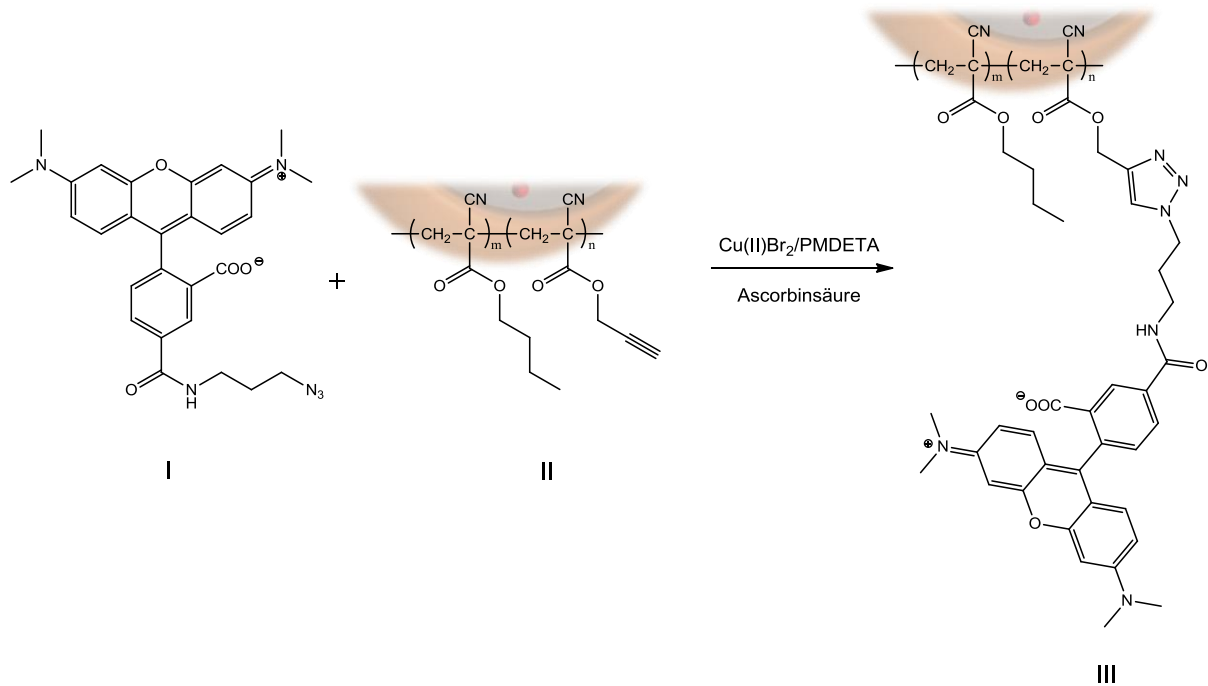


Abbildung 46: Schematische Darstellung der „Click-Reaktion“ zwischen TAMRA-Azid (I) und P(BCA-co-PCA) (II, mit R= -propargyl oder -butyl) zur Fluoreszenzmarkierung der Kapselhülle (III). Um deutlich zu machen, dass die Anbindung von TAMRA an der Kapseloberfläche stattfindet, ist ein Kapselausschnitt mit dargestellt.

Zur Überprüfung der doppelten Markierung von Kapselhülle und Kapselinhalt wurde **NK3** als wässrige Dispersion am CLSM bei einer Konzentration von  $75 \mu\text{g/mL}$  untersucht. Abbildung 47, B) veranschaulicht noch einmal die doppelte Fluoreszenzmarkierung der Kapseln **NK3**.

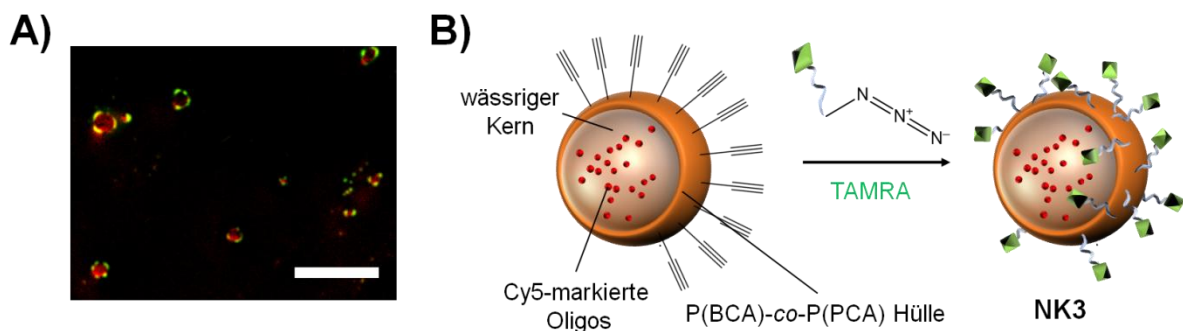


Abbildung 47: CLSM-Aufnahme der TAMRA-markierten Nanokapsel **NK3**, deren Inhalt aus Cy5-Oligos bestand. Das detektierte TAMRA-Signal ist grün, das Signal der Cy5-Oligos rot dargestellt (A)). Der Größenbalken beträgt  $25 \mu\text{m}$ . B) zeigt schematisch die Anbindung des Fluorophors TAMRA, wodurch die doppelt markierte Kapsel **NK3** hergestellt wurde.

Sowohl die TAMRA-Signale der Hülle als auch die Cy5-Signale des Kapselinhaltes konnten detektiert werden (Abbildung 47 A)), was auf eine erfolgreiche doppelte Fluoreszenzmarkierung schließen ließ. Dies war die Grundlage für nachfolgende Zellstudien in MSCs.

Für die Zellversuche wurden MSCs verwendet, weil diese die beste Freisetzung der Oligos aufwiesen und daher vermutet wurde, dass mit dieser Zelllinie das beste Ergebnis hinsichtlich Lokalisation von Kapselhülle und –inhalt erzielt werden kann. Die Zellen wurden 24 h mit **NK3** inkubiert und anschließend ohne zusätzliche Mitochondrienmarkierung am CLSM detektiert. In Abbildung 48 kann man sehr gut erkennen, dass das TAMRA-Signal der Kapselhülle (in grün abgebildet) meist unabhängig von Cy5-Signalen (in rot abgebildet), die wieder als fädige Strukturen erscheinen, auftritt.

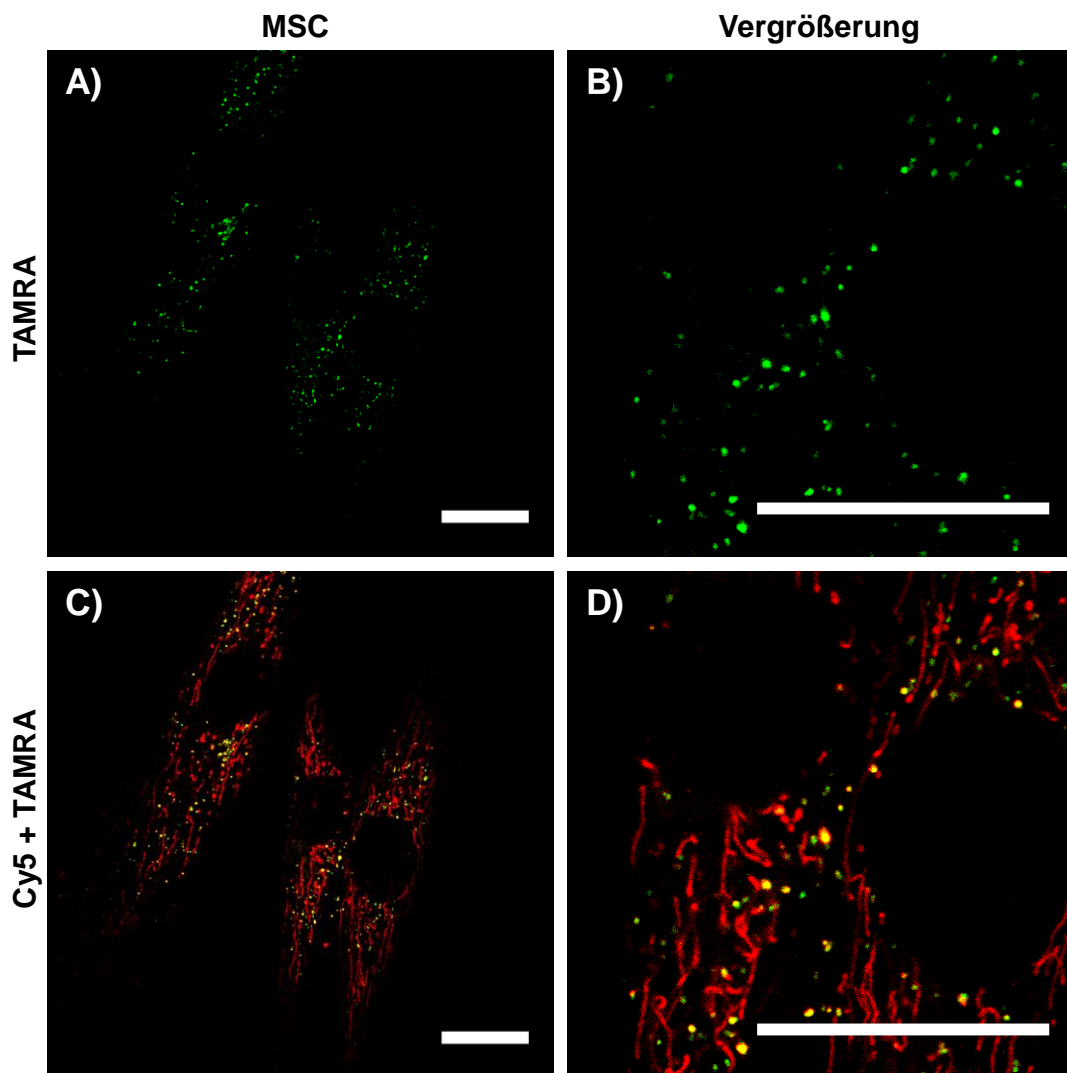


Abbildung 48: CLSM-Aufnahmen von MSCs, welche 24 h mit NK3 inkubiert wurden. Fluoreszenzsignale der TAMRA-markierten Kapselhülle sind in grün dargestellt. Diese konnten meist unabhängig von den Fluoreszenzsignalen der Cy5-Oligos (rot dargestellt) detektiert werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass nur freigesetzte Cy5-Oligos an Mitochondrien akkumulierten, jedoch nicht die Kapselhülle. Überlagerungs- bzw. Kolokalisations-Signale (erscheinen gelb) resultieren aus nicht freigesetzten Oligos. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Die Fluoreszenzsignale der Kapselhülle traten ausnahmslos als punktförmige Strukturen auf, was darauf schließen ließ, dass die Polymerhülle in Endosomen oder Lysosomen angereichert wurde und nicht wie der Kapselinhalt an Mitochondrien akkumulierte. Überlagerungen beider Fluoreszenzsignale erscheinen (Abbildung 48, C), D)) gelb und geben die Kolokalisation von Kapselhülle und -inhalt wieder. Diese gelben Kolokalisationssignale wurden allerdings ausschließlich als punktförmige Signale detektiert, wodurch man annehmen konnte, dass es sich hierbei um noch nicht freigesetzte Cy5-Oligos handelte und sich die Kapsel selbst in Endosomen oder Lysosomen befand. Es konnte damit gezeigt werden, dass nur die freigesetzten Cy5-Oligos an Mitochondrien akkumulierten, was die rot abgebildeten, fädigen Strukturen in Abbildung 48 demonstrieren, aber die Kapselhülle selbst an einer anderen Stelle in den Zellen verbleibt. Außerdem konnten auch Signale, die nur von der Kapselhülle stammten, detektiert werden. Diese erscheinen im Überlagerungsbild in Abbildung 48 als grüne Punkte. In diesem Fall lag keine Kolokalisation mit Cy5-Oligos vor. Man kann annehmen, dass es sich hierbei um Degradationsprodukte des Polymers der Kapselhülle handelte, welche in Endosomen oder Lysosomen lokalisiert waren.

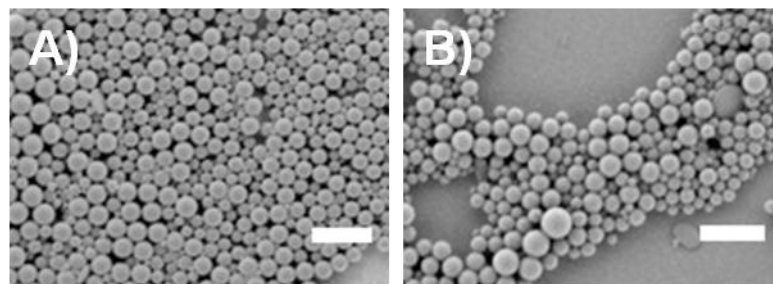
Grundlegend konnte mit der Studie zur intrazellulären Freisetzung einer Beladung aus PBCA-Kapseln beobachtet werden, dass sich Oligonukleotide, die mit Cy5 am 5'-Ende markiert wurden, an Mitochondrien anlagerten. Dies bietet die Möglichkeit, andere Moleküle wie etwa Wirkstoffe mit Cyanin-Farbstoffen kovalent zu markieren, um diese an Mitochondrien anzulagern. Mitochondriale Krankheiten werden oftmals durch Defekte im mitochondrialen Genom ausgelöst wie z. B. Mutationen in bestimmten mitochondrialen Proteinen, wodurch neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer resultieren können.<sup>191</sup> Eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials führt zu unkontrollierter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die DNA beschädigen können, wodurch die Tumorentstehung begünstigt wird.<sup>140</sup> Aufgrund dieser Tatsachen bietet unsere Studie ein zukunftsträchtiges Konzept für die Entwicklung von Gen- und Wirkstofftransportsystemen, um gezielt Mitochondrien zu beeinflussen. PBCA-Nanokapseln konnten von verschiedenen Zelllinien aufgenommen werden und entließen intrazellulär ihren Inhalt, wobei jedoch keinerlei toxische Effekte (innerhalb gewisser Grenzen) auftraten. Nutzt man die Kombination bestimmter Strukturen aus, wie z. B. die in dieser Arbeit verwendete Kombination aus Oligonukleotiden und des Farbstoffs Cy5, können aufgrund des hohen Membranpotentials der Mitochondrien, diese gezielt angesteuert werden, wodurch sich viele Möglichkeiten bieten auf mitochondriale Defekte einzugehen. Generell konnte nachgewiesen werden, dass aus den verwendeten Kapseln eine Freisetzung des Inhaltes in das Zytoplasma erfolgte, was ein hohes Potential bietet, Wirkstoffe intrazellulär freizusetzen. PBCA-Kapseln stellen somit attraktive Trägersysteme im Bereich „Drug Delivery“ dar.

## 5.2 P(HPMA)-*b*-P(LMA)-stabilisierte PS- und PDLLA-Nanopartikel

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass Nanopartikel, die durch das Block-Copolymer P(HPMA)-*b*-P(LMA) stabilisiert wurden, eine zukunftssträchtige Möglichkeit bieten, hydrophobe Wirkstoffe in Zellen zu transportieren. Aufgrund der Synthesemethode, die unter Kapitel 2.1.2 sowie 4.2.1 beschrieben wurde, können an das Block-Copolymer verschiedenen Funktionalitäten wie etwa diverse Fluoreszenz-Farbstoffe kovalent angebunden oder hydrophobe Farbstoffe im hydrophoben PS- oder PDLLA-Kern des Partikels eingebettet werden. Diese unterschiedlichen Markierungen dienen dazu, Aufschluss über einen möglichen Aufnahmemechanismus zu gewinnen, wie ein hydrophober Wirkstoff in Zellen gelangen könnte. Die verwendeten Nanopartikel wurden von Annette Kelsch synthetisiert und als wässrige Dispersion für die biologischen Versuche eingesetzt. Die nachfolgenden Ergebnisse zur Toxizität sowie die Abbildungen unter 5.2.3 wurden bereits unter Kelsch *et al.* veröffentlicht.<sup>175</sup>

### 5.2.1 Eingesetzte Partikel

Eigenschaften wie Größe, Zusammensetzung oder Markierung der Partikel können Tabelle 2 (Kapitel 4.1.2) entnommen werden. Abbildung 49 zeigt rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen P(HPMA)-*b*-P(LMA)-stabilisierter PS- sowie PDLLA-Partikel, die mit Hilfe der direkten Miniemulsion in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung hergestellt wurden.



**Abbildung 49:** REM-Aufnahmen der PDLLA-Partikel NP5 (A) sowie PS-Partikel NP6 (B), die durch das Block-Copolymer P(HPMA)-*b*-P(LMA) stabilisiert wurden, wobei zur Herstellung die Methode der direkten Miniemulsion in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung verwendet wurde. Der Größenbalken beträgt 1  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahmen wurden von Annette Kelsch angefertigt.

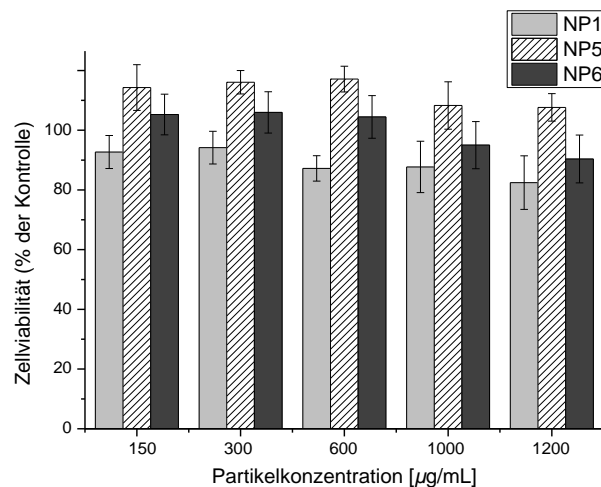
Die Aufnahmen zeigen Nanopartikel mit enger Größenverteilung, wobei für beide Partikelarten (PS-Kern bzw. PDLLA-Kern) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Partikelgröße auffielen. Auch weitere Charakterisierungsmethoden wie DLS-Messungen (siehe Tabelle 2) zeigten, dass mit beiden Polymeren (PS oder PDLLA) ähnlich große



Partikel hergestellt werden konnten, welche effektiv durch das Block-Copolymer stabilisiert wurden.

### 5.2.2 Toxizitätstest auf der Grundlage eines MTS-Assays

P(HPMA)-basierte Wirkstoff-Konjugate sind hinsichtlich ihrer Anwendung als polymere Therapeutika sehr genau untersucht worden.<sup>42, 192</sup> Dabei konnte auch nachgewiesen werden, dass keine Toxizität von HPMA-basierten Copolymeren bis zu 2 mg/mL ausgeht.<sup>193-194</sup> Es soll in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch Polymerpartikel, die mit Hilfe der Miniemulsionspolymerisation bzw. des Miniemulsionsprozesses in Kombination mit der Lösungsmittelverdampfung hergestellt und mit HPMA-basierten Block-Copolymeren stabilisiert wurden, Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität ebenfalls nicht beeinflussen. Deshalb wurde ein Toxizitätstest auf der Grundlage eines MTS-Assays an HeLa-Zellen durchgeführt (Abbildung 50).



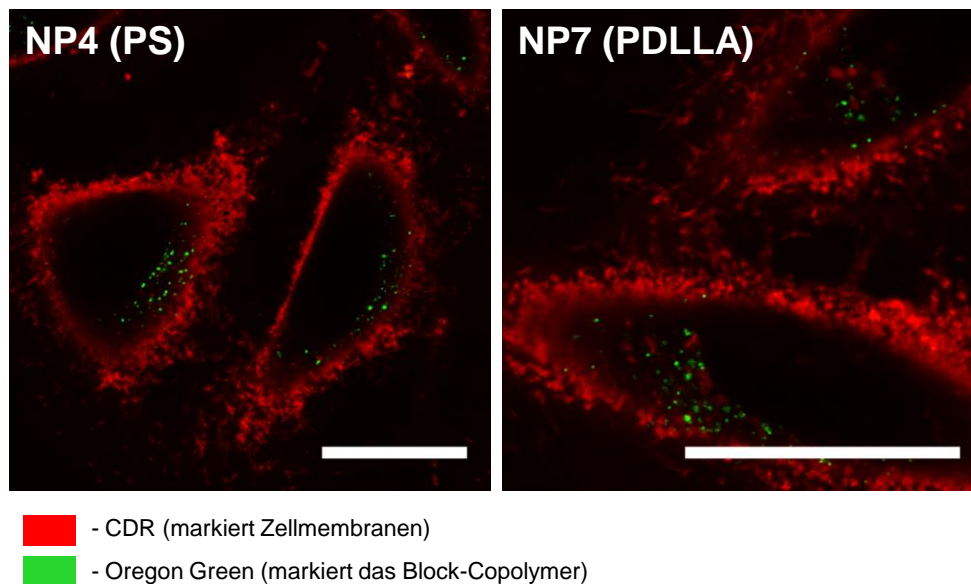
**Abbildung 50: MTS-Assay der Nanopartikel NP1, NP5 und NP6 in HeLa-Zellen nach 72 h. Die Nanopartikel wiesen auch bei sehr hohen Konzentrationen von bis zu 1.200  $\mu\text{g/mL}$  keine toxische Beeinflussung der Zellen auf. Die Zellviabilität lag deutlich über 80%. Modifiziert nach.<sup>175</sup>**

Es konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen Konzentrationen bis zu 1.200  $\mu\text{g/mL}$  keine toxische Beeinflussung der Zellen seitens der Nanopartikel auftrat. Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte für alle untersuchten Konzentrationen kein signifikanter Zelltod festgestellt werden. Für alle Konzentrationen konnte eine Zellviabilität von über 80% verglichen mit der Negativkontrolle verzeichnet werden.

Somit wurde bestätigt, dass nicht nur P(HPMA), welches als biokompatibles Polymer auch in der klinischen Forschung<sup>65-66</sup> Anwendung findet, sondern auch die synthetisierten P(HPMA)-basierten Block-Copolymeren als stabilisierende grenzflächenaktive Substanzen von Polymer-Nanopartikeln ebenfalls keinen toxischen Einfluss auf Zellen ausübten.

### 5.2.3 Aufnahmestudien Oregon Green-markierter Nanopartikel in HeLa-Zellen

Um eine Partikelaufnahme in Zellen nachweisen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Block-Copolymere zur Stabilisierung der Partikel eingesetzt, wodurch eine Detektion am CLSM ermöglicht wurde. Sowohl PS- als auch PDLLA-Nanopartikel wurden durch P(HPMA)-*b*-P(LMA) stabilisiert, an welches das Fluorophor Oregon Green kovalent angebunden wurde. HeLa-Zellen wurden 24 h mit diesen Partikeln inkubiert und anschließend am CLSM detektiert. Nach der angegebenen Inkubationszeit konnten beide Partikel in HeLa-Zellen detektiert werden (Abbildung 51).



**Abbildung 51: CLSM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation von NP4 sowie NP7 in HeLa-Zellen. Sowohl PS (NP4)-Partikel als auch PDLLA (NP7)-Partikel wurden in HeLa-Zellen aufgenommen. Der Größenbalken beträgt 25 µm. Der Farbcode ist der Legende in der Abbildung zu entnehmen (CDR: CellIMask™ Deep Red). Modifiziert nach.<sup>175</sup>**

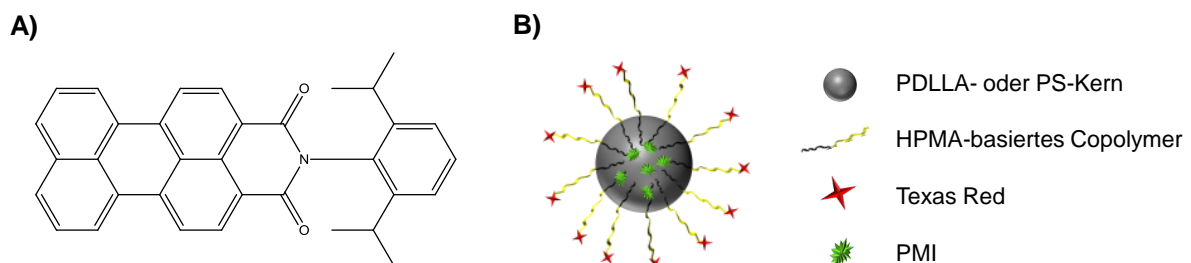
In beiden Fällen wies die Partikelaufnahme keine signifikanten Unterschiede auf, es konnten gleich viele Fluoreszenz-Spots des Oregon Green-markierten Block-Copolymers detektiert werden. Höcherl *et al.*<sup>195</sup> demonstrierten, dass die Aufnahme von PLLA-Partikeln im Vergleich zu PS-Partikeln größer ist. Jedoch wurden die Partikel aus jener Arbeit mit SDS

stabilisiert, welches als möglicher Grund für die Aufnahme-Unterschiede angesehen werden könnte. Ein anderes Tensid beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit des Partikels, wodurch die Zusammensetzung der Proteinkorona hinsichtlich der Proteinanteile verändert werden kann und es dadurch zur Beeinflussung der Partikel Aufnahme in Zellen kommen kann.<sup>196-197</sup>

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Polymerpartikel in HeLa-Zellen aufgenommen wurden, unabhängig welches Kernmaterial vorlag. Deshalb sollte im Anschluss getestet werden, wie sich die Partikel hinsichtlich ihrer Aufnahme in HeLa-Zellen verhalten, wenn ein hydrophober Farbstoff, der als hydrophobes Wirkstoffmodell angesehen werden soll, im Kern vorliegt.

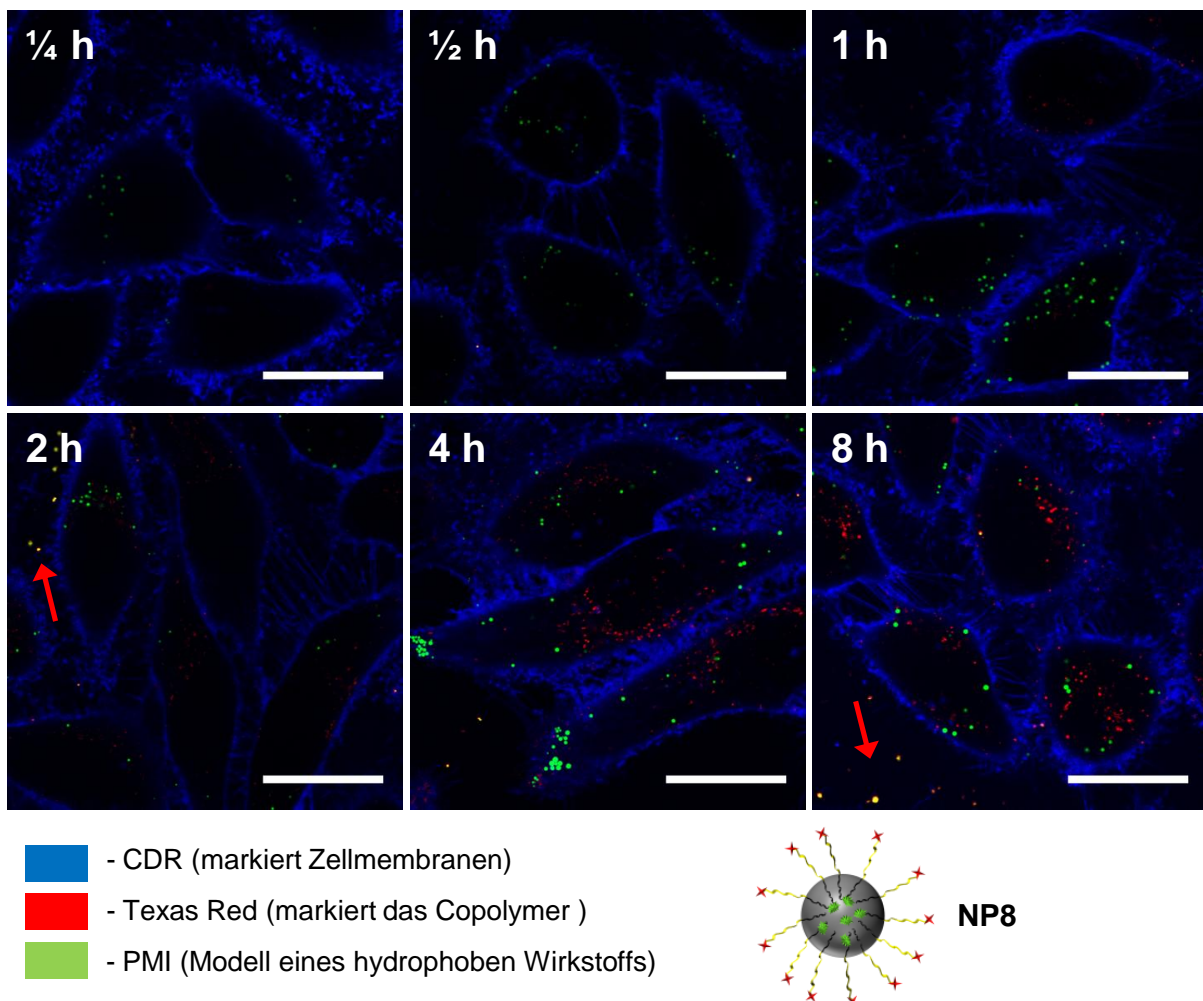
#### 5.2.4 Kinetikstudie zur Freisetzung von PMI als Wirkstoffmodell aus HPMA-basierten Nanopartikeln in HeLa-Zellen

Um die Fluoreszenz-Markierung von Copolymer und im Partikelkern eingelagertem Wirkstoffmodell gut separat voneinander *via* Laser anregen und entsprechend detektieren zu können, wurde auf einen anderen Farbstoff als Oregon Green zur Markierung des Block-Copolymers P(HPMA)-*b*-P(LMA) zurückgegriffen. In allen nachfolgenden Kapiteln werden Partikel beschrieben, deren stabilisierendes Block-Copolymer mit Texas Red kovalent markiert wurde. Als hydrophobes Wirkstoffmodell wurde der Farbstoff PMI (Perylenmonoimid, Abbildung 52, A)) verwendet, welcher aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen im PDLLA- bzw. PS-Kern vorlag. Abbildung 52, B) gibt schematisch den Aufbau des Nanopartikels wieder.



**Abbildung 52:** A) Strukturformel von PMI (*N*-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid), eines hydrophoben Fluorophors, welches als Wirkstoffmodell diente. B) Schematische Darstellung eines Nanopartikels, der mit HPMA-basierten Copolymeren stabilisiert und dessen Kern mit PMI markiert wurde.

PMI befand sich vor der Synthese der Partikel *via* Miniemulsion in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung in der dispersen Phase, in welcher auch die Polymere des Partikelkerns vorlagen (siehe Abbildung 20). Nach erfolgter Miniemulsion und anschließender Lösungsmittelverdampfung lagen Partikel vor, in deren hydrophoben Kern PMI angereichert war. Die nachfolgende Abbildung 53 zeigt CLSM-Aufnahmen der Aufnahmekinetik von Partikeln mit PDLLA-Kern. PS-Partikel verhalten sich in ähnlicher Weise.

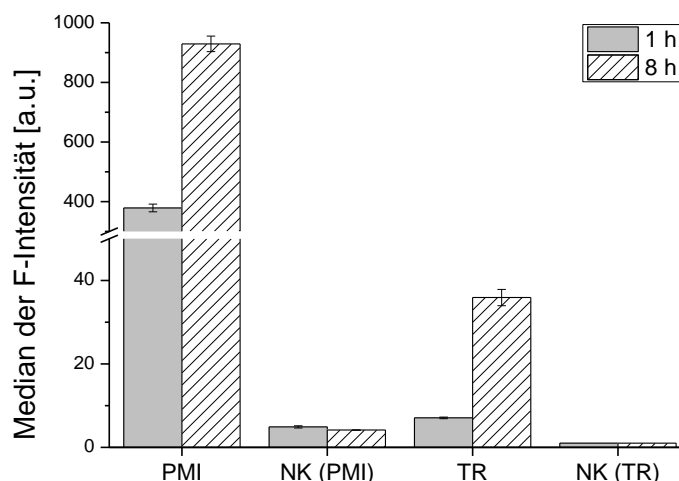


**Abbildung 53: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen, die die Kinetikstudie zur Freisetzung von PMI aus NP8 wiedergeben. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Rote Pfeile markieren Kolokalisation von PMI und Texas Red außerhalb von Zellen. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .**

Die Aufnahmekinetik (Abbildung 53) von **NP8** in HeLa-Zellen macht deutlich, dass PMI zuerst in die Zellen gelangte und der Partikel, der durch das fluoreszenzmarkierte Block-Copolymer detektiert werden konnte, nachfolgte. PMI konnte schon als schwaches Signal nach 15 min detektiert werden. Der Partikel selbst jedoch wurde erst nach ca. 2 h deutlich

sichtbar. Auffällig ist auch, dass innerhalb der Zellen keine Kolo­kalisierung von PMI und Texas Red erkannt werden konnte, was ein Anhaltspunkt dafür sein könnte, dass PMI und Partikel unabhängig voneinander in die Zellen aufgenommen wurden. Außerhalb der Zellen kolokalisierten beide Farbstoffe (siehe roter Pfeil innerhalb Abbildung 53), wodurch sichergestellt werden konnte, dass PMI zu Beginn dieser Studie tatsächlich in den Partikeln eingelagert war. Diese Kolo­kalisierung erscheint in den CLSM-Aufnahmen aus Abbildung 53 gelb.

Um die optischen Eindrücke dieser Kinetikstudie quantitativ zu untermauern, wurden Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei HeLa-Zellen nach 1 h und nach 8 h Inkubation mit **NP8** analysiert wurden. Die erhaltenen Ergebnisse, die Abbildung 54 zusammenfassend darstellt, wurden, wie unter 4.2.5 beschrieben, normiert, um Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Fluorophore auszugleichen. Sie unterstützen die Interpretation der Kinetikstudie aus Abbildung 53. PMI wurde nach 1 h Inkubation schon als sehr starkes Signal erfasst, während Texas Red nur als sehr schwaches Signal zu detektieren war. Im Vergleich dazu konnte nach 8 h Inkubation ein signifikant erhöhtes Signal von Texas Red erfasst werden. Das PMI-Signal war nach 8 h ebenfalls erhöht, was schlüssig erscheint, da bei längerer Inkubationszeit auch mehr PMI aufgenommen werden kann. Der optische Eindruck aus den CLSM-Aufnahmen konnte durch die durchflusszytometrischen Analysen nach 1 und 8 h Inkubationszeit erhärtet werden. PMI gelangte zuerst in die Zellen und Texas Red-markierte Partikel folgten nach.



**Abbildung 54:** Darstellung der *via* Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse zur Quantifizierung der Aufnahme von PMI- und Texas Red-markierten Nanopartikeln NP8 nach 1 und 8 h in HeLa-Zellen zur Unterstützung der Aussagen, die aus Abbildung 53 resultierten. NK: Negativkontrolle (= Zellen, die nicht mit Partikeln inkubiert wurden). TR: Texas Red.

In den CLSM-Aufnahmen konnte jedoch nach 1 h Inkubation mit **NP8** kein Texas Red-Signal der Partikel detektiert werden. Dies lässt sich allerdings damit erklären, dass die am Durchflusszytometer verwendeten Laser zum Anregen der Fluorophore eine höhere Intensität aufwiesen als die vergleichbaren Laser am CLSM und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal entstand. Dabei betrug die Anregungswellenlänge für PMI  $\lambda(\text{em}) = 488$  nm (bei CLSM und Durchflusszytometer) und für Texas Red  $\lambda(\text{em}) = 561$  nm am CLSM bzw.  $\lambda(\text{em}) = 560$  nm am Durchflusszytometer. Weiterhin muss beachtet werden, dass die CLSM-Bilder nur Momentaufnahmen von wenigen Zellen darstellen, wohingegen am Durchflusszytometer ca. 20.000 Zellen analysiert wurden.

Wie bereits erwähnt, befanden sich die Signale von PMI und Texas Red nicht an den gleichen intrazellulären Regionen, sie kolokalisierten nicht. Im Folgenden soll Aufschluss darüber gegeben werden, in welchen intrazellulären Regionen PMI akkumulierte.

### 5.2.5 Aufnahme von PMI in „Lipid Droplets“

Um den intrazellulären Verbleib von PMI bestimmen zu können, wurden zunächst HeLa-Zellen mit **NP2** (PDLLA) sowie **NP3** (PS) inkubiert und die resultierenden Transmissionsbilder der Zellen mit Fluoreszenz-Bildern des detektierten intrazellulären PMIs miteinander verglichen (Abbildung 55). Dabei konnte festgestellt werden, dass PMI sowohl aus PDLLA (**NP2**) als auch PS-Partikeln (**NP3**) genau dort angereichert wurde, wo sich im Transmissions (TM)-Bild helle bzw. dunkle, vesikelartige Regionen befanden (Abbildung 55, C), F)). Mittels Transmission können v. a. Regionen abgebildet werden, die einen großen Unterschied im Brechungsindex zum umgebenden Medium aufweisen. Dies führte zu der Annahme, dass die hellen bzw. dunklen, vesikelartigen Bereiche eine hohe Konzentration an Lipiden aufweisen müssen, da das umgebende Medium fast ausschließlich aus wässrigen Komponenten bestand (Zellmedium). Es hat damit den Anschein, als ob sich PMI in lipidreiche Organellen einlagert.

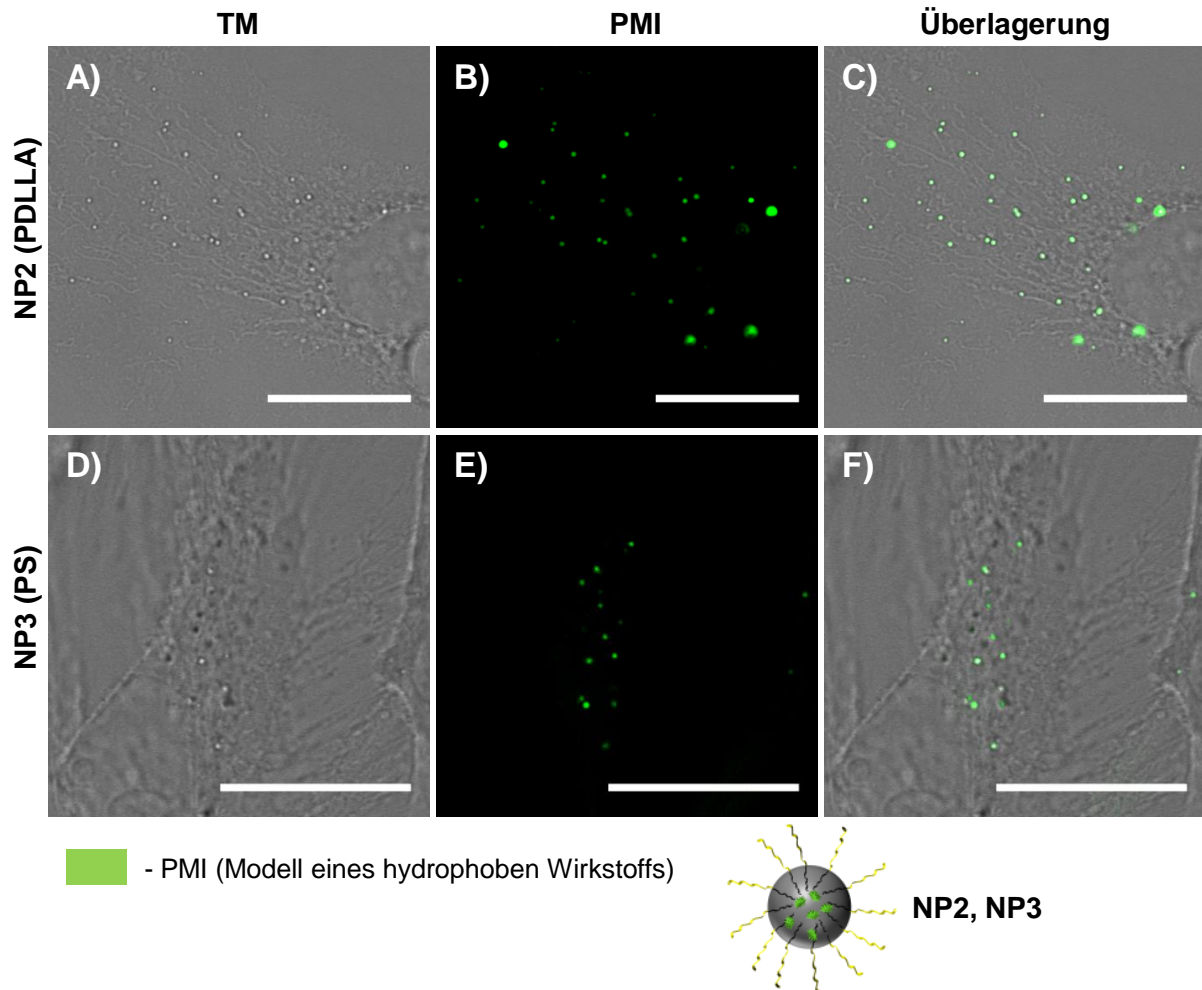


Abbildung 55: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit NP2 und NP3, welche nur mit PMI fluorescent markiert wurden. Lipidreiche Regionen im Transmissions (TM)-Bild (A, D)), die als helle und dunkle Punkte erscheinen, weisen in der Überlagerung (C, F)) mit der PMI-Fluoreszenz (B, E)) Kolokalisation auf. Der Größenbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Betrachtete man auf der anderen Seite Partikel, deren stabilisierendes Block-Copolymer durch kovalent angebundenes Oregon Green markiert wurde (siehe dazu Kapitel 2.3), wie im Beispiel von **NP4** (PS), so konnte man keine Kolokalisation dieser lipidreichen Vesikel mit der Fluoreszenz der Block-Copolymere detektieren (Abbildung 56). Das lässt die Vermutung zu, dass sich die Partikel selbst nicht in lipidreichen Domänen anreicherten wie im Falle von PMI. Man kann im Überlagerungsbild aus Abbildung 56 deutlich erkennen, dass die Fluoreszenz-Spots des markierten Partikels nicht mit den entsprechenden hellen bzw. dunklen Regionen aus dem Transmissionsbild übereinstimmen.

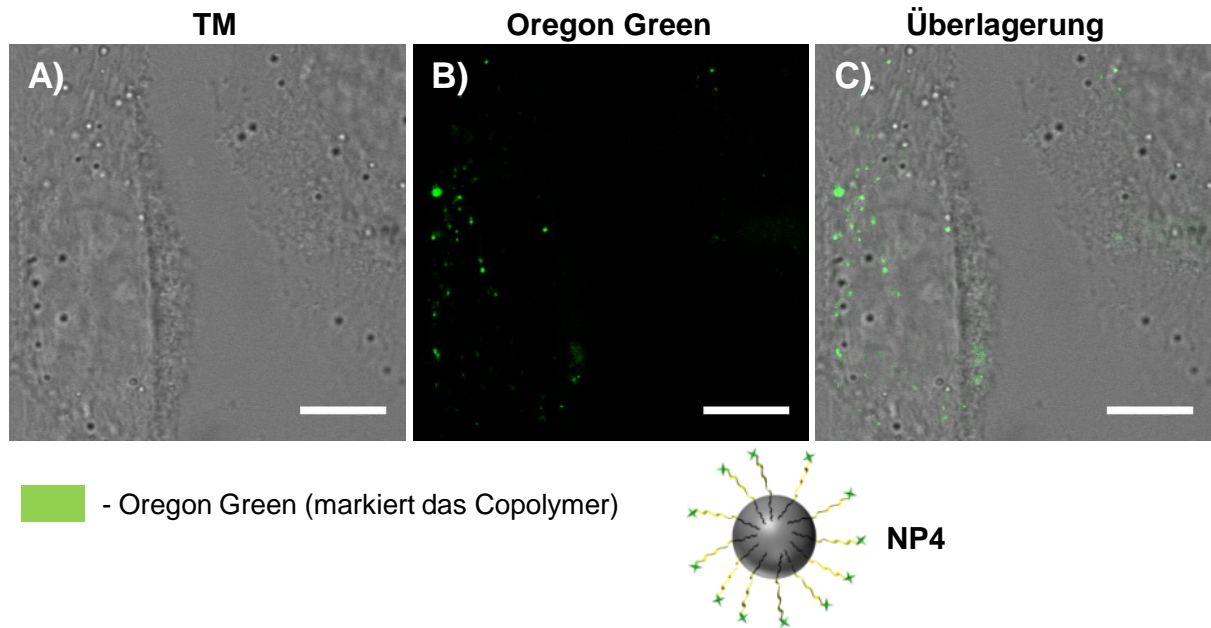


Abbildung 56: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit Partikel NP4, welcher am Copolymer mit Oregon Green fluorescent markiert wurde. Lipidreiche Domänen im TM-Bild (A) weisen in der Überlagerung (C) mit der PMI-Fluoreszenz (B) keine Kollokalisierung auf. Der Größenbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 57 zeigt den Unterschied in den Strukturformeln der Fluorophore PMI und Oregon Green Cadaverin. Aufgrund der Strukturen war zum einen eine Einbettung von PMI in den hydrophoben Kern und zum anderen eine kovalente Anbindung von Oregon Green an das Block-Copolymer möglich. Die kovalente Anbindung an das Block-Copolymer P(HPMA)-*b*-P(LMA) wurde durch die polymeranaloge Umsetzung der verwendeten Reaktivester-Polymere garantiert (siehe dazu auch 2.1.2).

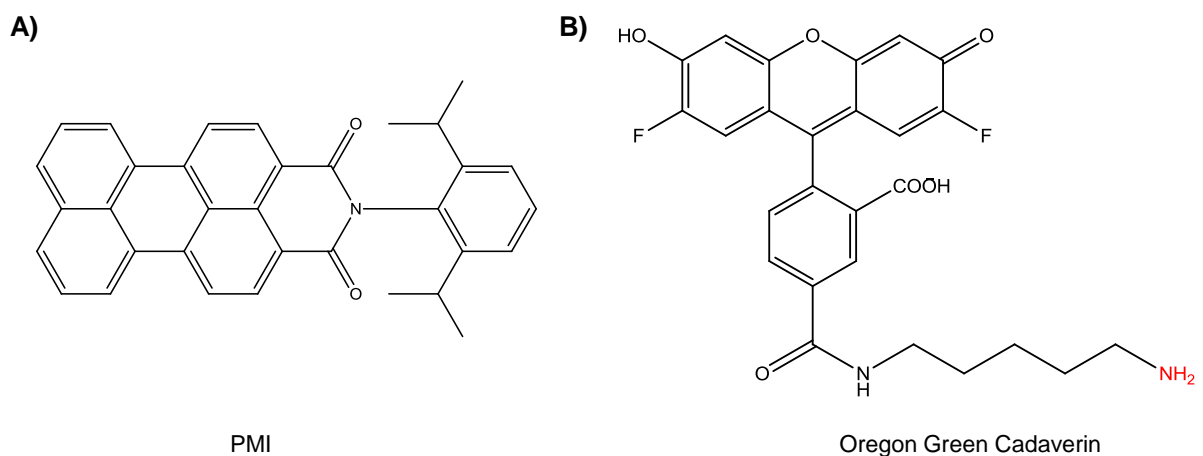


Abbildung 57: Strukturformeln der Fluorophore PMI und Oregon Green Cadaverin. Die Stelle zur kovalenten Anbindung ist rot markiert.

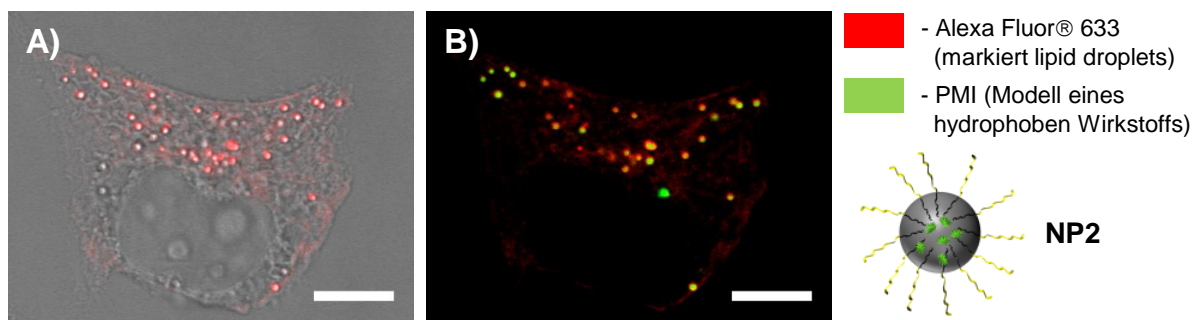


Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit bereits veröffentlichten Daten<sup>175</sup> wurde die Inkubationszeit von 24 h für Partikel **NP4** eingehalten. Mittels dieser Ergebnisse wurde sichergestellt, dass sich die Partikel nach Aufnahme in HeLa-Zellen (siehe auch Abbildung 51) nicht in Lipidtröpfchen befinden, sondern vermutlich in Endosomen oder Lysosomen.

Lipidreiche Domänen innerhalb Zellen werden auch „Lipid Droplets“ genannt und bezeichnen Organellen, die Triglyceride und Cholesterin speichern.<sup>198</sup> Aufgrund der hohen Hydrophobizität dieser Organellen scheint es möglich, dass sich auch das hydrophobe Wirkstoffmodell PMI dort einlagern kann.

Um zu zeigen, dass es sich bei den detektierten Regionen tatsächlich um sogenannte „Lipid Droplets“ handelte, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, die im Detail unter 4.2.8 beschrieben wurde. Bei diesem Versuch wurden nur PDLLA-Partikel verwendet, da diese als bioabbaubare Polymere relevanter sind als PS-Partikel (siehe Kapitel 2.1.3). Dazu wurden HeLa-Zellen 24 h mit den PDLLA-Partikeln **NP2** inkubiert und anschließend die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

In Abbildung 58, B) lassen sich präzise die Regionen erkennen, die einen grünen Kern mit roter Korona aufweisen. Der grüne Kern bezeichnet PMI, welches in Lipidtröpfchen eingelagert war. Rote Signale verweisen auf den sekundären Antikörper, welcher „Lipid Droplets“ markierte und als Fluorophor Alexa Fluor® 633 trug.



**Abbildung 58:** CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen, nach 24 h Inkubation mit PDLLA-Partikeln NP2 und Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion der „Lipid Droplets“. A) stellt die Überlagerung des TM-Bildes mit Fluoreszenzsignalen des sekundären Antikörpers dar, welcher mit Alexa Fluor® 633 markiert war. In B) ist die Überlagerung der Fluoreszenz des sekundären Antikörpers mit der Fluoreszenz von PMI zu sehen. Der Farbcode ist der Legende zu entnehmen. Der Größenbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

In der Überlagerung des TM-Bildes mit Fluoreszenzsignalen des sekundären Antikörpers geht deutlich hervor, dass die rote Korona ebenfalls um die hellen Bereiche im TM-Bild erscheint. Dadurch wurde eindeutig bewiesen, dass sich PMI in „Lipid Droplets“ einlagerte. Die Tatsache, dass sich hydrophobe Moleküle in lipidreiche Regionen innerhalb der Zelle

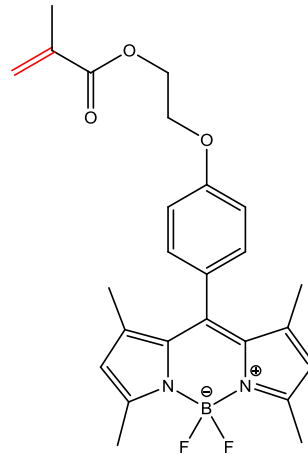
ansammeln, wurde schon von Hofmann *et al.*<sup>180</sup> beobachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Freisetzung hydrophober Moleküle aus polymeren Nanopartikeln über einen diffusionsgetriebenen Mechanismus verlief, ohne dass die Partikel selbst aufgenommen werden mussten. Dieser Mechanismus beinhaltete eine kurzzeitige Interaktion der Nanopartikel mit der Oberfläche der Zellmembran und eine darauf folgende schnelle Freisetzung der hydrophoben Moleküle, die letztendlich in „Lipid Droplets“ akkumulierten. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass dieser Vorgang innerhalb weniger Minuten erfolgte.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Studien durchgeführt, die Aussagen darüber liefern sollten, ob die Aufnahme von PMI diffusionsgetrieben oder mittels Endozytose erfolgte. Es konnte gezeigt werden, dass PMI *via* Diffusion in Zellen gelangte, da man auch bei niedrigen Temperaturen noch PMI-Signale am CLSM detektieren konnte. Stoffwechsel- und aktive Aufnahmeprozesse sind jedoch bei niedrigen Temperaturen deutlich reduziert.

Die bisherigen Untersuchungen bezogen sich fast ausschließlich auf die Freisetzung des Wirkstoffmodells PMI. Dabei wurde die Aufnahme der Partikel nur durch die Detektion des stabilisierenden Block-Copolymers P(HPMA)-*b*-P(LMA) bestätigt. Doch um sicherzustellen, dass tatsächlich der gesamte Partikel und nicht nur das Copolymer aufgenommen wurde, sind Studien angeschlossen worden, die sich mit doppelt kovalent markierten Partikeln auseinandersetzten. Diese werden im nachfolgenden Kapitel erläutert.

### **5.2.6 Kinetikstudie in HeLa-Zellen mit doppelt kovalent markierten Nanopartikeln**

Um einen eindeutigen Beweis zu erlangen, dass die gesamten Partikel und nicht nur die stabilisierenden Block-Copolymere aufgenommen wurden, erfolgte eine ebenfalls kovalente Fluoreszenzmarkierung direkt an den Partikelkernen. Dazu wurde das Monomer des Fluorophors B504-MA<sup>199</sup> (Bodipy, synthetisiert von Dr. Roland Staff, Abbildung 59) mit dem Styrol-Monomer mittels freier radikalischer Polymerisation copolymerisiert (durchgeführt von Dr. Roland Staff), wodurch PS fluoreszenzmarkiert wurde. Details zur Synthese können dem Artikel von Schäffel *et al.* entnommen werden.<sup>199</sup> Die Partikel wurden anschließend mittels Miniemulsion in Kombination mit der Lösungsmittelverdampfung hergestellt, wobei Texas Red-markiertes P(HPMA)-*b*-P(LMA) Block-Copolymer zur kolloidalen Stabilisierung diente. Die Herstellung der Partikel erfolgte analog der Vorgehensweise, die unter 4.2.1.2 beschrieben ist (siehe Abbildung 20).



Bodipy

**Abbildung 59: Strukturformel des Fluorophors B504-MA (Bodipy), welches zur Fluoreszenzmarkierung der PS-Ketten verwendet wurde. Die Stelle, an der die Polymerisation erfolgt, ist rot markiert.**

Durch die Anbindung von Bodipy in den PS-Ketten und das Verwenden des Texas Red-markierten Block-Copolymers als Tensid, welches ebenfalls eine kovalente Anbindung des Fluorophors Texas Red aufwies, konnten doppelt kovalent fluoreszenzmarkierte PS-Nanopartikel **NP9** hergestellt werden.

HeLa-Zellen wurden 8 und 24 h mit **NP9** inkubiert. Nach 8 h ist in den CLSM-Aufnahmen (Abbildung 60, A-C)) deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzsignale von Bodipy, welches den PS-Kern markiert und von Texas Red, welches das Block-Copolymer markiert, an den gleichen intrazellulären Regionen zu detektieren waren und damit kolokalisierten. Die Partikel werden also als Ganzes (Polymer-Kern und Block-Copolymer) aufgenommen. Deshalb kann man annehmen, dass die Signale, die bislang detektiert wurden, ausschließlich die gesamten Partikel darstellten.

Bei einer Inkubationszeit von 24 h (Abbildung 60, D-F)) fiel jedoch auf, dass die Fluoreszenzsignale zwar noch oftmals kolokalisierten, allerdings deutlich mehr Signale des Block-Copolymers detektiert werden konnten als Signale des Partikelkerns. Alle Bilder aus Abbildung 60 wurden in gleicher Weise bearbeitet, so dass man nicht von einem Bildbearbeitungseffekt ausgehen kann. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass sich das Block-Copolymer intrazellulär nach 8 h vom Partikelkern ablöste. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die gesamten Partikel und nicht nur das stabilisierende Block-Copolymer aufgenommen wurden. Zur Bestätigung der Hypothese des intrazellulären Ablösens des Block-Copolymers wurde eine quantitative Auswertung angeschlossen, die nachfolgend im Detail Erklärung findet.

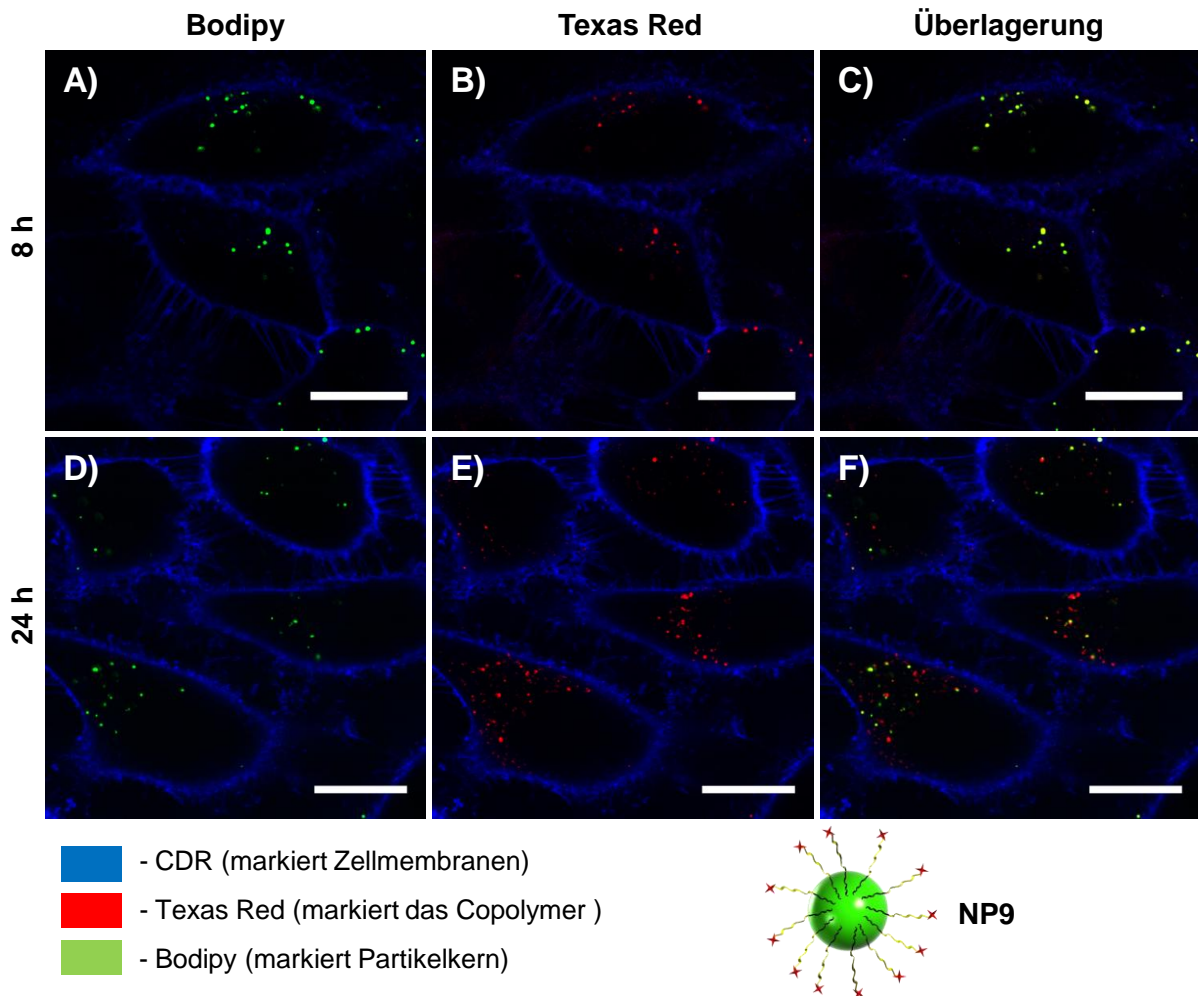
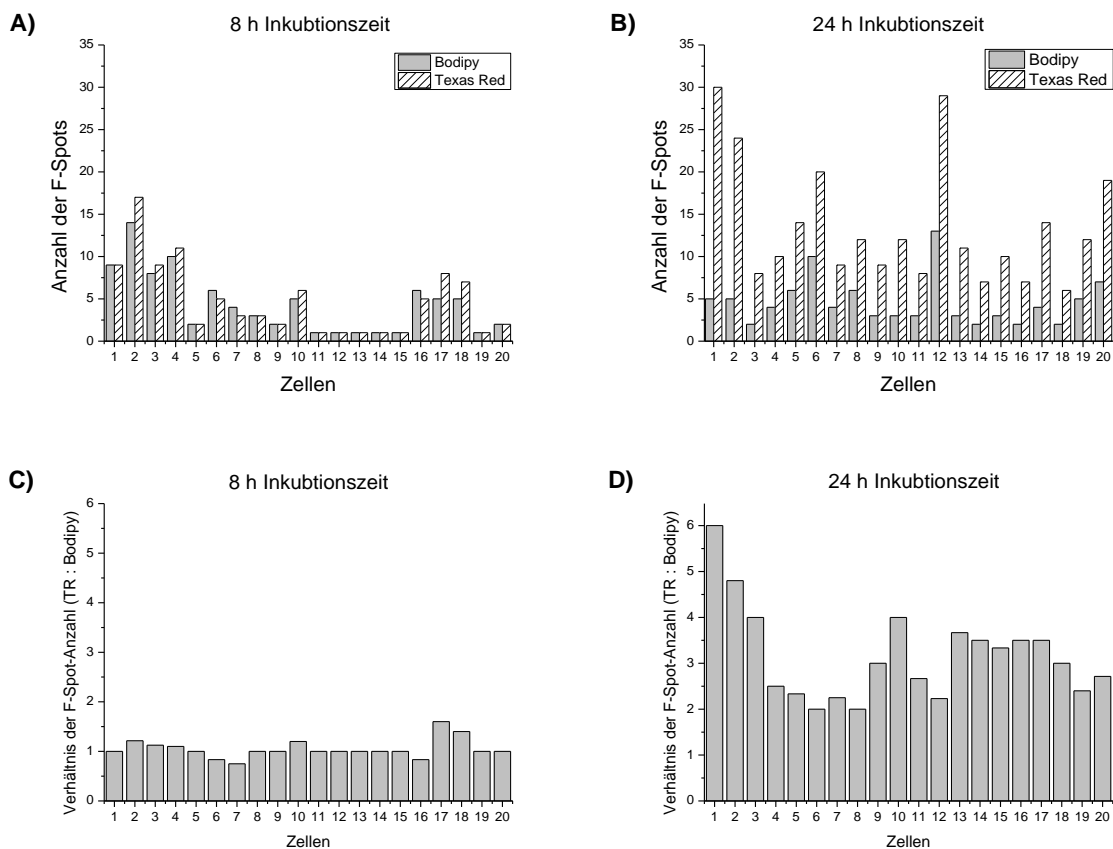


Abbildung 60: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 8 (A-C) und 24 h (D-F) Inkubation mit NP9. Die Fluoreszenzsignale von Bodipy und Texas Red sind jeweils als Einzelkanalbilder sowie in der Überlagerung gezeigt. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.7 Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®

Die quantitative Erfassung der Fluoreszenzsignale von Bodipy und Texas Red, welche den Partikelkern bzw. das stabilisierende Block-Copolymer markierten, wurde mittels Volocity® anhand von 20 Einzelzellen durchgeführt. Nachdem HeLa-Zellen 8 und 24 h mit **NP9** inkubiert und am CLSM detektiert wurden, sind zunächst die Einzelzellen aus den CLSM-Aufnahmen (ähnlich den Aufnahmen aus Abbildung 60) erfasst (ausgeschnitten) worden. Im Anschluss ist ein für jede Zelle gleichbleibendes Auswerteprotokoll hinsichtlich Anzahl der Fluoreszenz-Spots von Bodipy und Texas Red angewandt worden. Die Diagramme A) und B) in Abbildung 61 stellen Histogramme für jede Inkubationszeit dar, in welchen jeweils 20 Einzelzellen bezüglich ihrer Anzahl an Fluoreszenz-Spots (F-Spots) aufgelistet wurden. Zum besseren Verständnis sind in Abbildung 61, C) und D) außerdem die Verhältnisse der Anzahl der F-Spots wiedergegeben.

Nach 8 h war die Anzahl der Fluoreszenz-Spots von Bodipy (= Partikelkern) und Texas Red (= stabilisierendes Block-Copolymer) annähernd äquivalent (Abbildung 61, A)), was durch das Verhältnis der Anzahl der F-Spots zueinander, das bei jeder ausgewerteten Zelle nahe 1 liegt, untermauert wird (Abbildung 61, C)). Das heißt, dass zwar nur eine mäßige Partikelaufnahme stattgefunden hat, jedoch das stabilisierende Block-Copolymer noch nicht vom Partikelkern abgelöst war. Diese geringfügige Partikelaufnahme stimmt mit den Bildern aus Abbildung 60 überein.

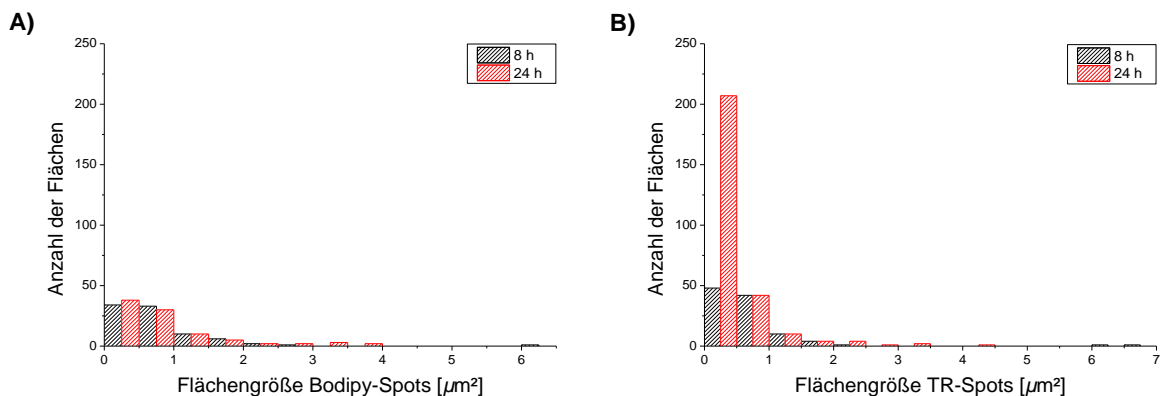


**Abbildung 61: Quantitative Auswertung von 20 Einzelzellen mit Volocity®, die das intrazelluläre Ablösen des Block-Copolymers vom Partikelkern verdeutlichen soll. A) gibt die Anzahl der Fluoreszenz-Spots (F-Spots) von Bodipy und Texas Red nach 8 h und B) nach 24 h Inkubationszeit wieder. Zum besseren Verständnis geben C) und D) das Verhältnis der Anzahl der F-Spots wieder. Nach 24 h ist ein deutlicher Anstieg in der Menge der F-Spots von Texas Red zu erkennen. TR: Texas Red.**

Betrachtet man das Histogramm für 24 h Inkubationszeit (Abbildung 61, B)), dann sieht man deutlich den Unterschied in der Anzahl der Fluoreszenz-Spots. Die Texas Red-Signale sind in deutlich höherer Anzahl vorhanden als die Bodipy-Signale, was durch das Verhältnis der Fluoreszenz-Spots ebenfalls wiedergespiegelt wird (Abbildung 63, D)). Das lässt die Aussage zu, dass die Annahme des intrazellulären Ablöses des Block-Copolymers vom Partikelkern durch diese Quantifizierung bestätigt wird. Weiterhin kann festgestellt werden,

dass die Anzahl der Fluoreszenz-Spots von Bodipy im Vergleich zu 8 h Inkubationszeit nicht wesentlich zunahm, was darauf hindeutet, dass auch nach 24 h die Aufnahme der Partikel nur mäßig war.

Die bereits getroffenen Aussagen konnten mit einer weiteren quantitativen Auswertung unterstützt werden, die die Flächen der Fluoreszenz-Spots als Grundlage verwendete. Die Fläche der Fluoreszenz-Spots von Bodipy-markierten Partikeln (Abbildung 62, A)) weist nach 8 h nahezu keinen Unterschied im Vergleich zu 24 h Inkubation auf. Dem gegenüber steht die Flächenauswertung der Fluoreszenz-Spots von Texas Red-markierten Block-Copolymeren (Abbildung 62, B)). Hier konnten signifikant viele kleine Flächenwerte nach 24 h verzeichnet werden. Nach 8 h jedoch sind die Flächenwerte annähernd gleich zu denen von Bodipy-markierten Partikeln, was wiederum dafür spricht, dass bis zu 8 h Inkubation kein Ablösen des Block-Copolymers vom Partikelkern erfolgte. Die hohe Anzahl der kleinen Spots nach 24 h bestätigte die Annahme des intrazellulären Ablöses des Block-Copolymers vom Gesamtpartikel.



**Abbildung 62:** Graphische Darstellung der Verteilung der Flächengröße der Fluoreszenz-Spots aus Abbildung 61. A) stellt die Daten für das Bodipy-Signal nach 8 und 24 h dar, B) bildet die Verteilung der Flächen der Texas Red (TR)-Signale ab.

Die Annahme, dass sich das Block-Copolymer intrazellulär vom Partikelkern ablöste und sich zu mizellenartigen Konstrukten wieder zusammenlagerte, konnte durch die Auswertung, die in Abbildung 62 dargestellt ist, bestätigt werden. Denn die Flächen der Fluoreszenz-Spots von Bodipy und Texas Red unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Größe. Würde sich das Block-Copolymer nicht ablösen, so wären die Flächengrößen der F-Spots gleich groß.

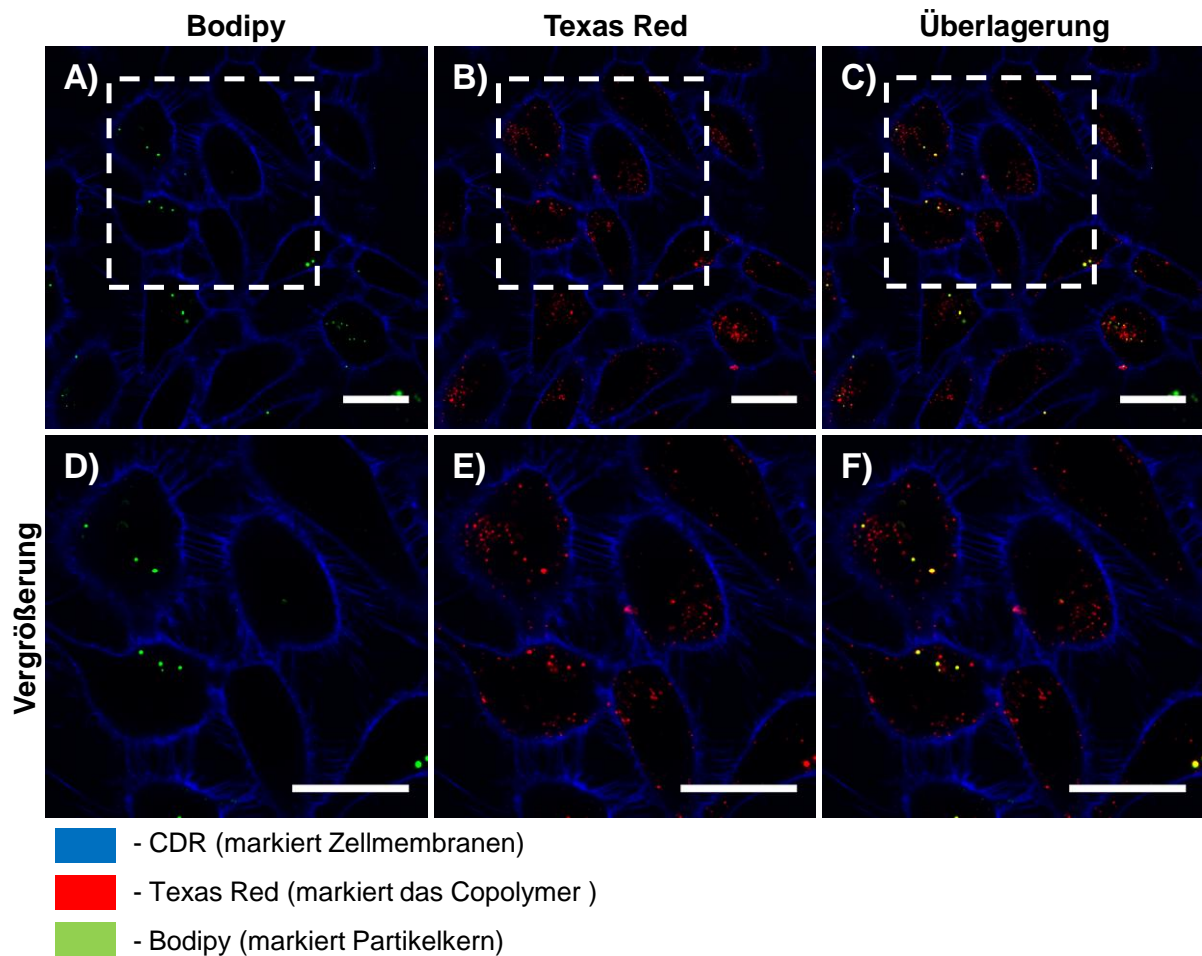
Das bereits aus den Koloalisationsstudien mit PBCA-Kapseln (Vergleich 5.1.2) bekannte Auftreten verschiedener Zellpopulationen konnte auch hier wieder beobachtet werden. Nimmt man Abbildung 61 nochmals näher in Augenschein, so kann nicht nur der Hinweis auf

ein intrazelluläres Ablösen des Block-Copolymers erkannt werden. Die unterschiedlich große Anzahl an Bodipy-Spots in verschiedenen Zellen (sowohl nach 8 h als auch nach 24 h Inkubation) deutet ebenfalls darauf hin, dass vermutlich je nach Phase des Zellzyklus unterschiedlich viele Partikel aufgenommen werden konnten.

### **5.2.8 Varianz der Kettenlänge von LMA im Hinblick auf die Stabilisation der Nanopartikel**

Um die Hypothese des intrazellulären Ablöses des Block-Copolymers vom Partikelkern bestätigen zu können, wurden Nanopartikel **NP10** synthetisiert, deren stabilisierendes Block-Copolymer einen längeren, hydrophoben LMA-Block aufwies, um so eventuell eine noch bessere Stabilisierung der Partikel zu erzielen. Das Design von **NP9** wurde sonst beibehalten und außer der längeren LMA-Kette nicht weiter modifiziert (siehe Kapitel 4.1.2, Tabelle 2).

Da aus 5.2.7 bekannt war, dass sich nach 24 h das Block-Copolymer zu einem großen Anteil von den Partikeln abgelöst hat, wurden HeLa-Zellen auch in den Anschlussexperimenten mit **NP10** 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Detektion am CLSM unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, die auch in den Versuchen unter 5.2.6 Anwendung fanden. Abbildung 63 zeigt deutlich, dass auch bei längerem LMA-Block im Block-Copolymer ein intrazelluläres Ablösen desselben von den Partikeln nicht zu verhindern war. In den vergrößerten CLSM-Aufnahmen (Abbildung 63, D), F)) können neben wenigen Fluoreszenz-Spots Bodipy-markierter Partikel viele flächenmäßig kleinere Fluoreszenz-Spots Texas Red-markierter Block-Copolymere identifiziert werden. Die Block-Copolymerketten scheinen sich aber noch nicht alle vollständig von den Partikeln abgelöst zu haben, da man in der Überlagerung aus beiden Fluoreszenzkanälen (Abbildung 63, C), F)) erkennen kann, dass Bodipy- und Texas Red-Signale kolokalisierten.



**Abbildung 63:** CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24 h (A-C) Inkubation mit NP10. Neben Bodipy-Signalen sind viele kleine F-Spots von Texas Red zu erkennen, wodurch das intrazelluläre Ablösen des Block-Copolymers bestätigt wird. Die Fluoreszenzsignale von Bodipy und Texas Red sind jeweils als Einzelkanalbilder sowie in der Überlagerung gezeigt. Das gleiche gilt für die Vergrößerung (D-F)). Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Abschließend kann gesagt werden, dass aufgrund von intrazellulären Prozessen, die nicht genauer untersucht wurden, ein Ablösen des stabilisierenden Copolymers vom Partikelkern nach 24 h Inkubation mit Bodipy-markierten PS-Partikeln zu verzeichnen war. Dabei konnte auch ein höherer LMA-Anteil im Copolymer, der die Stabilisierung der Nanopartikel erhöhen sollte, das Ablösung in den Zellen nicht verhindern. Diese Gegebenheit hatte allerdings keinen Einfluss auf die Aufnahme der Nanopartikel, da diese außerhalb der Zellen gut stabilisiert wurden und das Copolymer erst in den Zellen selbst abgelöst wurde. Dadurch können HPMA/LMA-stabilisierte Nanopartikel als vielversprechende Transportsysteme für Wirkstoffe in Betracht kommen.



### 5.2.9 Übersicht über einen möglichen Verlauf des Aufnahmewegs eines hydrophoben Wirkstoffs

Die Dokumentation und Detektion der Freisetzung von Wirkstoffmodellen stand im Fokus dieser Arbeit. Die nachfolgende Übersicht (Abbildung 64) soll allerdings einen möglichen Verlauf des Aufnahmeweges eines „verkapselten“ hydrophoben Wirkstoffes aufzeigen und alle getroffenen Aussagen der vorigen Abschnitte zusammenfassen. Das Schema aus Abbildung 64 ist nicht maßstabsgetreu, und aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde eine etwas andere Darstellung der Nanopartikel gewählt als die, die bislang verwendet wurde.

Zusammenfassend soll gezeigt werden, dass die Freisetzung von hydrophoben Wirkstoffen nicht nur intrazellulär stattfindet, sondern schon vorher beginnen kann. Diese Schlussfolgerungen wurden hauptsächlich anhand der Untersuchungen mit **NP8** getroffen. Der Beginn der Freisetzung setzt vermutlich genau dann ein, wenn Nanopartikel mit der Zellmembran in Kontakt kommen. Jedoch müssen die Nanopartikel für eine erste Freisetzung nicht aufgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel im zeitlichen Verlauf erst deutlich nach dem Wirkstoffmodell PMI detektiert werden konnten. Dadurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Freisetzung eines Wirkstoffs bereits vor der eigentlichen Aufnahme der polymeren Trägerpartikel erfolgen kann. Die Grundlage für die Freisetzung eines hydrophoben Wirkstoffes wie im Modellsystem PMI ist vermutlich in hydrophoben Wechselwirkungen mit Zellkompartimenten zu suchen.

Daneben wurde anhand der Studien mit **NP9** konstatiert, dass sich das stabilisierende Block-Copolymer bis zu 8 h Inkubationszeit noch am Partikelkern befindet, sich allerdings nach längerer Inkubationszeit vom Kern ablöst, so dass nach 24 h deutlich mehr Fluoreszenz-Spots des Texas Red-markierten Block-Copolymers detektieren ließen als von Bodipy-markierten Kernen. Die Vermutung liegt nahe, dass intrazelluläre Prozesse, die das Ablösen des Block-Copolymers fördern, zugrundeliegen. Diese wurden jedoch aufgrund ihrer Komplexität nicht weiter untersucht.

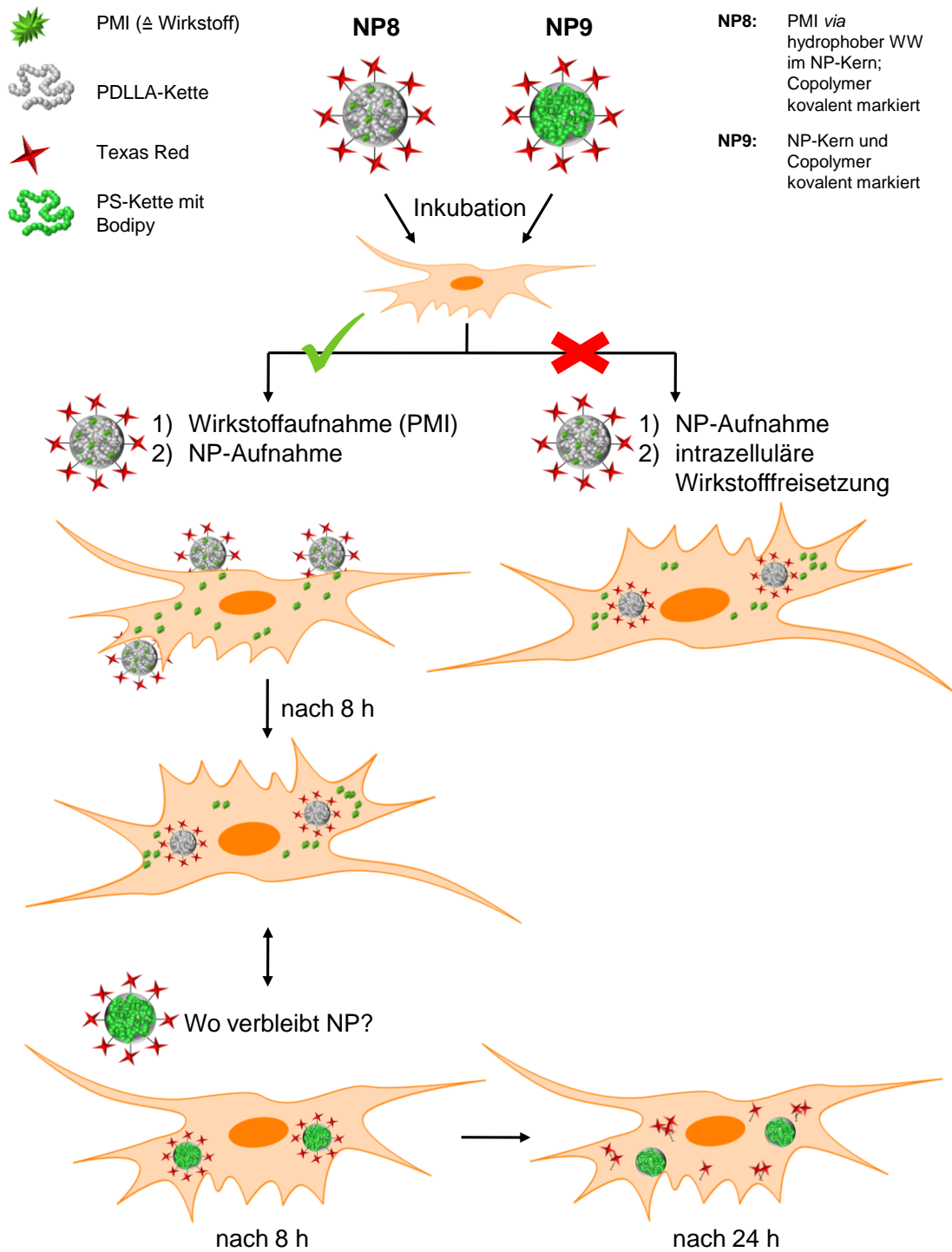
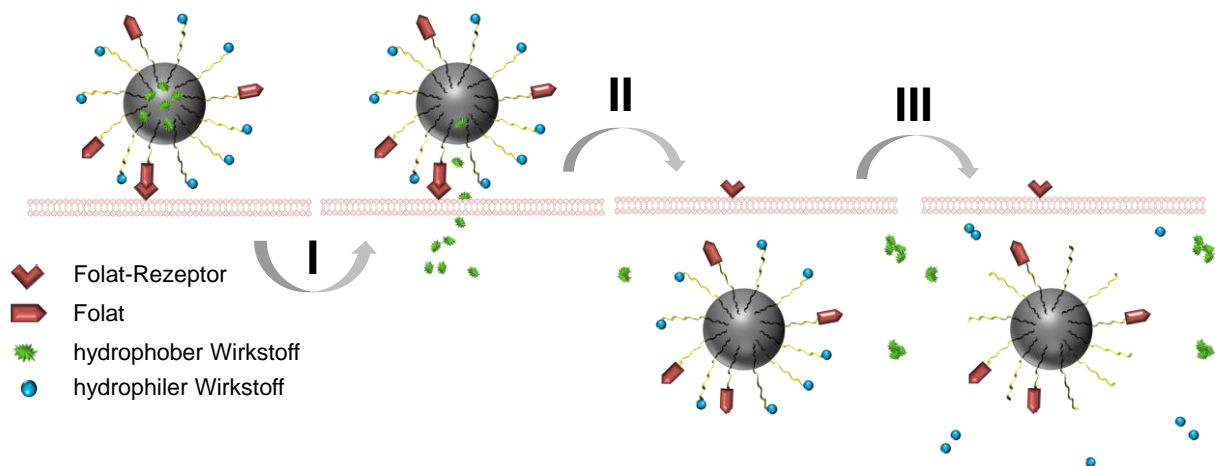


Abbildung 64: Nicht maßstabsgetreue Darstellung eines möglichen Verlaufs zur Aufnahme bzw. Freisetzung hydrophober Wirkstoffmodelle am Beispiel von PMI. Desweiteren ist der intrazelluläre Verbleib von Partikelkernen und deren stabilisierende Block-Copolymere dargestellt.

Grundsätzlich konnte eine moderate Partikelaufnahme verzeichnet werden. Zur Steigerung der Aufnahme sowie einer spezifischen Aufnahme durch Tumorzellen könnte eine Ankopplung von Folat an den hydrophilen Block (HPMA-Block) des stabilisierenden Block-Copolymers beitragen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Krebszellen eine verstärkte Expression von Folat-Rezeptoren aufweisen,<sup>200</sup> so dass durch die Anbindung von Folat an den HPMA-Block gezielt Krebszellen angesteuert werden könnten.

Um das System der HPMA/LMA-stabilisierten Nanopartikel als „Drug Delivery“-System ausnutzen zu können, ist weiterhin denkbar, dass neben der Einbettung eines hydrophoben Wirkstoffs im Partikelkern ein weiterer Wirkstoff am stabilisierenden Block-Copolymer angebunden wird. So hätte man eine Möglichkeit gleichzeitig einen hydrophoben Wirkstoff schnell freizusetzen und einen hydrophilen Wirkstoff über einen längeren Zeitraum kontrolliert über enzymatische Abbauprozesse intrazellulär freizusetzen. In Abbildung 65 ist diese Idee noch einmal bildlich dargestellt. Desweiteren könnten die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse eine Basis für weiterführende Arbeiten darstellen, die sich mit der vollständigen Aufklärung des Mechanismus der Wirkstofffreisetzung befassen.



**Abbildung 65:** Skizzierte Darstellung von der Idee der Freisetzung eines hydrophoben sowie eines hydrophilen Wirkstoffs, die sich zusammen in bzw. an einem Nanopartikel befinden, welcher mit Folat funktionalisiert ist. In Schritt I ist die Anbindung des Nanopartikels über einen Folat-Rezeptor gezeigt, wodurch die Freisetzung des hydrophilen Wirkstoffes initiiert wird. Nach Partikelaufnahme in Schritt II wird in Schritt III intrazellulär der hydrophile Wirkstoff freigesetzt.

### 5.3 Nanohydrogele zur Komplexierung von siRNA

Basierend auf bereits veröffentlichten Studien von Nuhn *et al.*<sup>179</sup> sollte ein möglicher Grund gefunden werden, weshalb mit den verwendeten 100 nm großen Nanohydrogelpartikeln bislang keine Erfolge in Knockdown-Versuchen erzielt werden konnten, wenn diese mit siRNA beladen waren. Dem gegenüber stehen Anschlussstudien mit kleineren Partikeln, mit welchen ein Knockdown in HeLa-Zellen erreicht wurde. Eine naheliegende Erklärung erscheint darin, dass aufgrund der Größe eine zeitlich unterschiedliche Anreicherung der verschieden großen Partikel in Lysosomen erfolgte. Durch die Aufnahme der mit siRNA beladenen Nanohydrogelpartikel in Lysosomen könnte es zum Abbau der siRNA kommen, wodurch sie nicht mehr zum Auslösen eines Knockdowns zur Verfügung stehen würde.

#### 5.3.1 Eingesetzte Nanohydrogelpartikel

In den nachfolgenden TEM- und SEM-Aufnahmen (Abbildung 66) sind die in dieser Arbeit verwendeten Nanohydrogelpartikel gezeigt, welche durch Lutz Nuhn synthetisiert wurden.

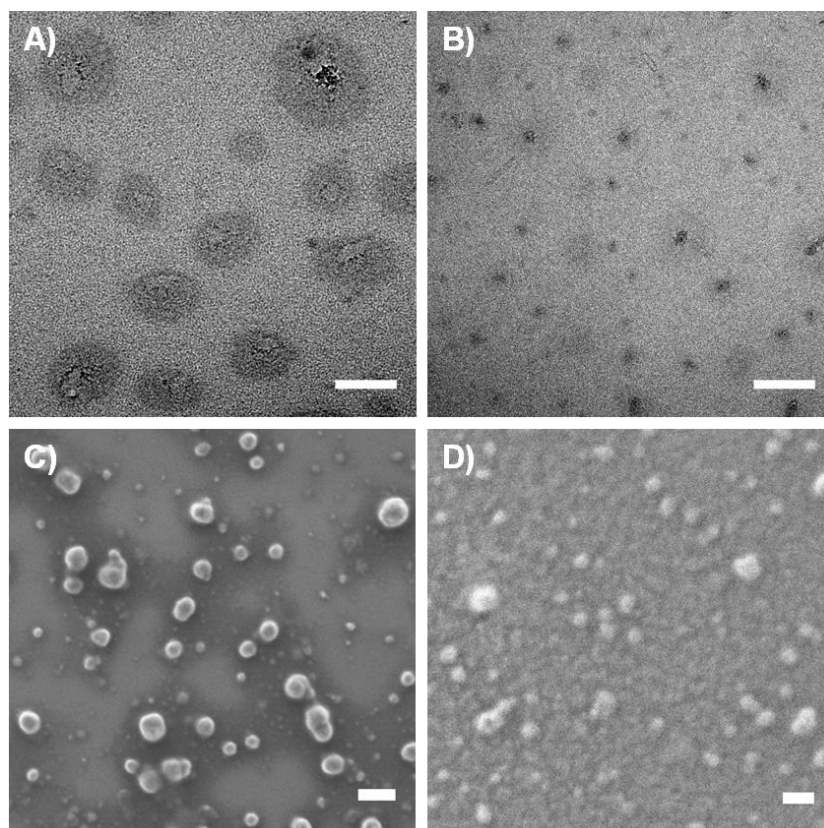
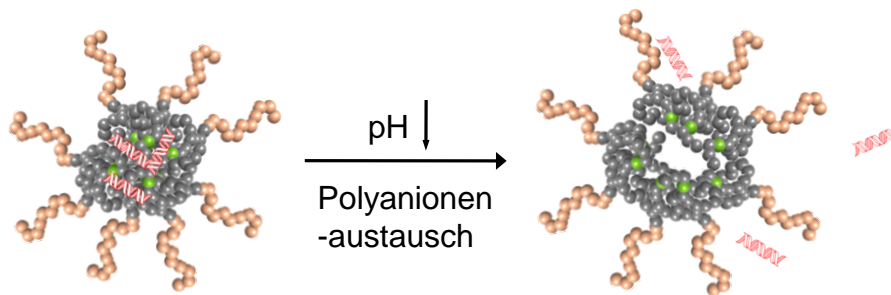


Abbildung 66: TEM- und SEM-Aufnahmen der Nanohydrogelpartikel. In A) und C) sind Partikel NHP1 mit einem Durchmesser von 100 nm dargestellt und in B) sowie D) Partikel NHP2, die einen Durchmesser von 40 nm aufwiesen. Der Größenbalken beträgt 100 nm. Die TEM-Aufnahmen wurden von Claudia Messerschmidt, die SEM-Aufnahmen von Annette Kelsch angefertigt.

Die verwendeten Partikel wiesen eine Größe von 40 nm und 100 nm auf. Den Größenunterschied kann man deutlich in Abbildung 66 erkennen. Der Unterschied in der Größe resultierte aus der Verwendung von Block-Copolymeren bei der Herstellung der Partikel, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterschieden (siehe Tabelle 4 aus 4.1.2). Das Konzept der Herstellung dieser Partikel wurde bereits in Kapitel 4.2.1.3 detailliert beschrieben. Die Partikel wiesen nur diesen Unterschied in der Größe auf. Die physikochemischen Eigenschaften in Bezug auf ihre Zusammensetzung oder dem Beladungs- und Freisetzungsvermögen von siRNA war identisch. Bei der Beladung der Partikel mit siRNA wurde ein Massenverhältnis von 25:1 (Nanohydrogelpartikel:siRNA) gewählt, um sicher zu stellen, dass keine freie siRNA mehr nach der Komplexbildung vorlag. Dieses Verhältnis wurde anhand von Gelelektrophorese-Studien ermittelt (durchgeführt von Lutz Nuhn). Die Idee der Freisetzung von siRNA wird in Abbildung 67 skizziert.



**Abbildung 67:** Darstellung der Freisetzungsidee von siRNA aus NHPs, die aufgrund einer pH-Wert-Absenkung geringfügig quellen und dabei einen Austausch mit anderen Polyanionen ermöglichen.

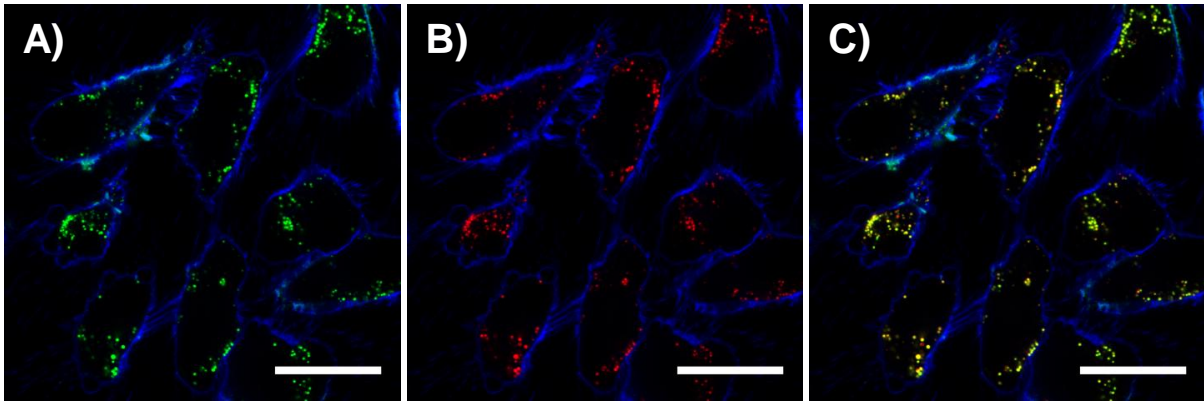
Gelangen Nanohydrogelpartikel aus dem extrazellulären Raum, welcher einen physiologischen pH-Wert von 7,4 aufweist, in Endosomen, so liegt ein niedrigerer pH-Wert vor (Abbildung 9). Dies hat zur Folge, dass die Nanohydrogelpartikel etwas quellen können und dadurch das Austreten der siRNA aus dem Partikelkern erleichtert wird. Zusätzlich wird angenommen, dass eine Freisetzung durch einen Austausch mit zelleigenen Polyanionen (z. B. mRNA, tRNA) gefördert wird, welche die siRNA aus den Nanohydrogelpartikeln verdrängen können. Entsprechende Versuche hierzu wurden von Lutz Nuhn durchgeführt, wodurch festgestellt werden konnte, dass z. B. durch Zugabe von Heparin, als Beispiel einer negativ geladenen Substanz, die siRNA erfolgreich aus den Partikeln freigesetzt werden konnte. Ein weiterer Hinweis zur Bestätigung dieses Freisetzungsmechanismus lieferte auch die Untersuchung der Freisetzung Cy5-markierter Oligonukleotide aus Nanohydrogelpartikeln, die in Kapitel 5.3.5 ausführlich beschrieben wird. In Lysosomen jedoch beginnen Verdauungsprozesse, die zum Abbau organischer Substanzen wie beispielsweise siRNA führen (Vergleich Kapitel 2.6.2).

Um Aufschluss darüber zu geben, ob und wie schnell die verwendeten Nanohydrogelpartikel in Lysosomen gelangen, wurden Aufnahmestudien in HeLa-Zellen am CLSM durchgeführt, in welchen die Kolokalisation von Oregon Green-markierten Nanohydrogelpartikeln mit LysoTracker® Red-markierten Lysosomen detektiert und anschließend mit Volocity® analysiert wurde. Auf einen vorausgehenden Toxizitätstest wurde verzichtet, da bereits in Zusammenhang mit den dazugehörigen Knockdown-Studien (von Lutz Nuhn durchgeführt) kein Einfluss auf die Zellviabilität gefunden wurde. Die entsprechenden Daten sind in der Doktorarbeit von Lutz Nuhn detailliert dargestellt. Mittels Zellviabilitäts-Assay konnte gezeigt werden, dass HeLa-Zellen, die stabil Luciferase exprimierten (HeLa-Luc) keine Beeinträchtigung der Zellviabilität aufwiesen, wenn sie 48 h mit Nanohydrogelpartikeln inkubiert wurden, welche zuvor mit anti-Luciferase codierender siRNA (luc-siRNA) beladen wurden. Dabei wurden siRNA-Konzentrationen von bis zu 400 nM bzw. Nanohydrogelpartikel-Konzentrationen von bis zu 56 µg/L untersucht. In allen Fällen lag die Zellviabilität bei 100% bezogen auf unbehandelte Zellen. Der Assay wurde an HeLa-Luc durchgeführt, da diese von Lutz Nuhn auch für die weiterführenden Knockdown-Studien verwendet wurden. Durch diese Studien konnte er demonstrieren, dass die 40 nm großen Nanohydrogelpartikel, welche mit luc-siRNA beladen waren, ein deutliches Knockdown-Potential aufwiesen, was u. a. aufgrund der reduzierten Luciferase-Lumineszenz gezeigt wurde.

### 5.3.2 Intrazellulärer Verbleib der Nanohydrogelpartikel nach der Aufnahme in HeLa-Zellen

Zunächst wurde eine Aufnahmestudie mit **NHP1** in HeLa-Zellen durchgeführt, um aufzuklären, ob sich die Nanohydrogelpartikel, welche einen Durchmesser von ca. 100 nm aufwiesen tatsächlich in Lysosomen anreichern. Dazu wurden HeLa-Zellen 24 h mit **NHP1** inkubiert, anschließend die Lysosomen mit LysoTracker® Red markiert und nach Anfärben der Zellmembranen mit CellMask™ Deep Red am CLSM detektiert. Die Partikel wurden ohne siRNA-Beladung hinsichtlich ihrer Anreicherung in Lysosomen getestet.

Nach 24 h konnte nahezu jeder Partikel (Abbildung 68, A)) in Lysosomen (Abbildung 68, B)) detektiert werden, was aufgrund der Kolokalisation im Überlagerungsbild (Abbildung 68, C)) der Fluoreszenzsignale von Oregon Green und LysoTracker® Red nachzuvollziehen ist.



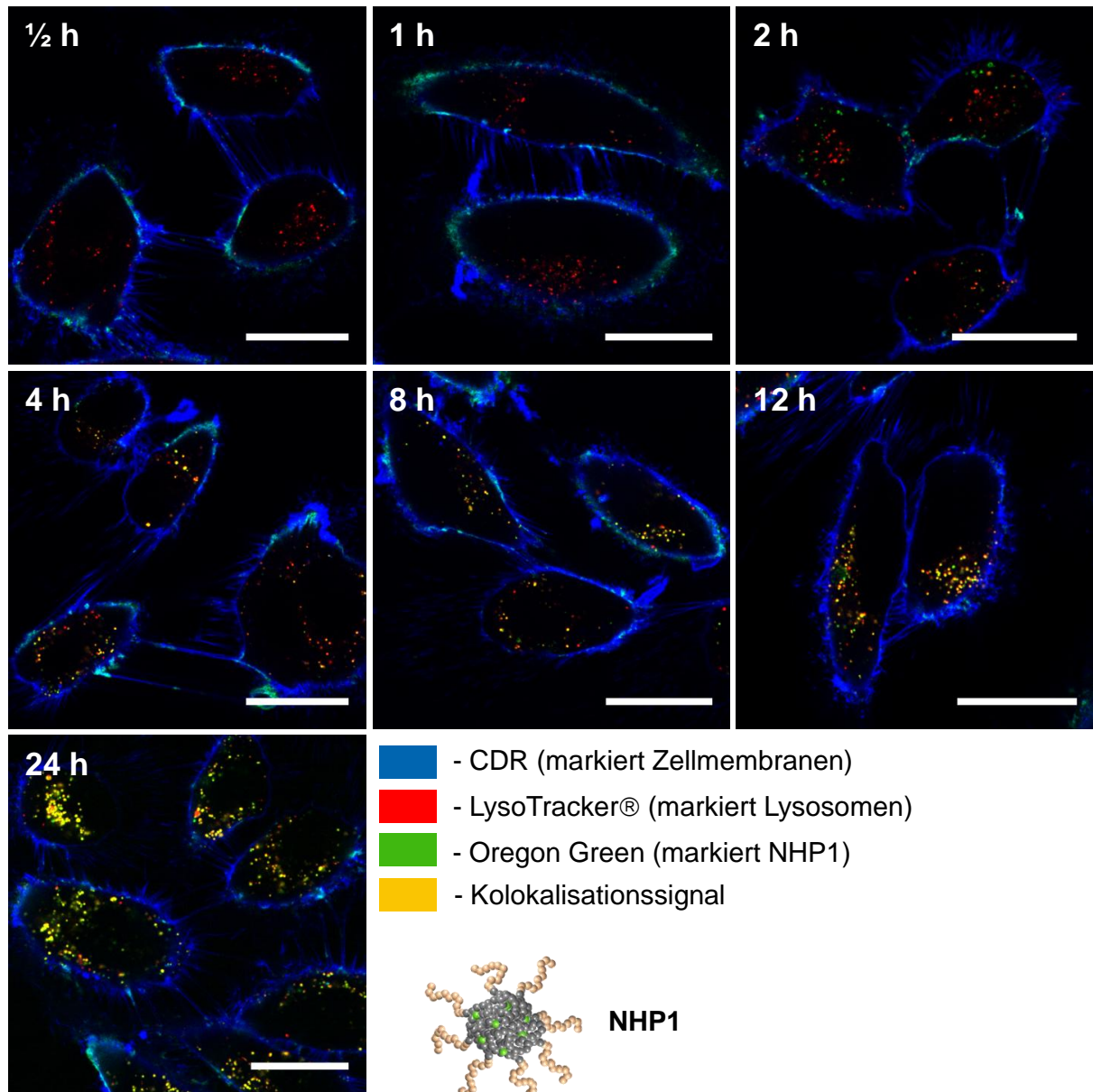
**Abbildung 68:** CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen, die 24 h mit NHP1 inkubiert und anschließend mit LysoTracker® Red behandelt wurden. Die Partikel sind grün (A)), die Lysosomen rot (B)) und die Zellmembranen in allen Aufnahmen blau dargestellt. Das Überlagerungs- bzw. Kollokalisationsignal erscheint in C) gelb. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Die Tatsache, dass nach 24 h Inkubation alle Partikel in Lysosomen vorlagen, könnte einen Hinweis darauf darstellen, dass mit diesen Partikeln kein Knockdown ermittelt werden konnte, da die Partikel eventuell zu schnell in Lysosomen gelangten und dadurch die siRNA schneller abgebaut wurde (im Vergleich zu den untersuchten kleineren Partikeln), als dass sie einen Knockdown hätte hervorrufen können. Deswegen wurde im Anschluss eine Kinetikstudie durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollte, ab wann **NHP1** in Lysosomen akkumulieren.

### 5.3.3 Kinetikstudie zur Anreicherung der Partikel in Lysosomen

In dieser Kinetikstudie wurden die Inkubationszeiten in einem Bereich von 30 min bis zu 24 h gewählt. Dabei wurden HeLa-Zellen mit **NHP1** inkubiert und im Anschluss die Lysosomen durch LysoTracker® Red markiert. Eine Auswahl an repräsentativen CLSM-Aufnahmen ist in Abbildung 69 dargestellt.

Nach einer Inkubation von 2 h kann man deutlich räumlich voneinander unabhängige Fluoreszenzsignale Oregon Green-markierter NHP1 (grün abgebildet) und LysoTracker®-markierter Lysosomen (rot abgebildet) erkennen. Dies lässt die Interpretation zu, dass bis zu diesem Zeitpunkt der Großteil an endozytierten Partikeln noch nicht in Lysosomen aufgenommen wurde.



**Abbildung 69:** CLSM-Aufnahmen der Kinetikstudie mit NHP1 in HeLa-Zellen. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Ab einer Inkubationszeit von 4 h schienen fast alle Partikel in den Lysosomen akkumuliert zu sein, da nahezu alle Signale der Partikel mit den Signalen der Lysosomen kolokalisierten, d. h. die Signale der Partikel und die Signale der Lysosomen an der gleichen Position innerhalb der Zellen vorzufinden waren. Je länger die Inkubationszeit gewählt wurde, desto stärker erkennt man das Kolokalisationssignal. Es reicherten sich damit im Laufe der Inkubationszeit immer mehr Partikel in den Lysosomen an. Dies ist zu erwarten, da sich generell *via* Endozytose aufgenommene Substanzen nach gewisser Zeit in Lysosomen wiederfinden lassen (Vergleich Abbildung 9 aus Kapitel 2.4). Die Aufgabe dieser Studie lag in der Feststellung, wie schnell die Partikel in Lysosomen gelangten. Um den Grad der



Kolokalisation für jede Inkubationszeit genauer feststellen zu können, wurden die CLSM-Aufnahmen mittels Volocity® quantifiziert. Dies wird im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben.

Um vergleichen zu können, ob sich Nanohydrogelpartikel, die mit siRNA beladen wurden, hinsichtlich ihrer Anreicherung in Lysosomen in gleicher Weise verhalten, wurde der mittlere Zeitpunkt der Kinetik, d. h. 12 h Inkubation, für den nachfolgenden Inkubationstest gewählt. Bevor HeLa-Zellen in gleicher Weise mit siRNA beladenen Partikeln **NHP1** inkubiert und markiert wurden, ist die siRNA 30 min bei Raumtemperatur in **NHP1** komplexiert worden.

Abbildung 70 zeigt eine CLSM-Aufnahme nach 12 h Inkubation mit siRNA beladenen Partikeln. Es konnte im Vergleich zu ungeladenen Partikeln kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

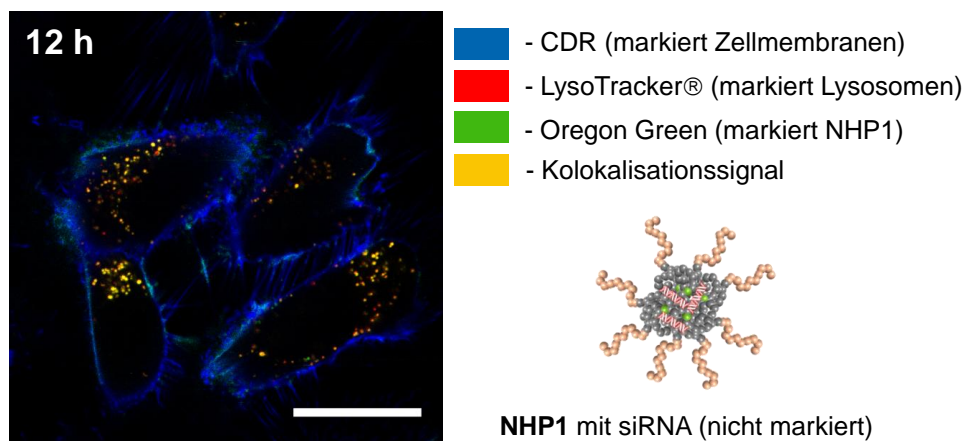


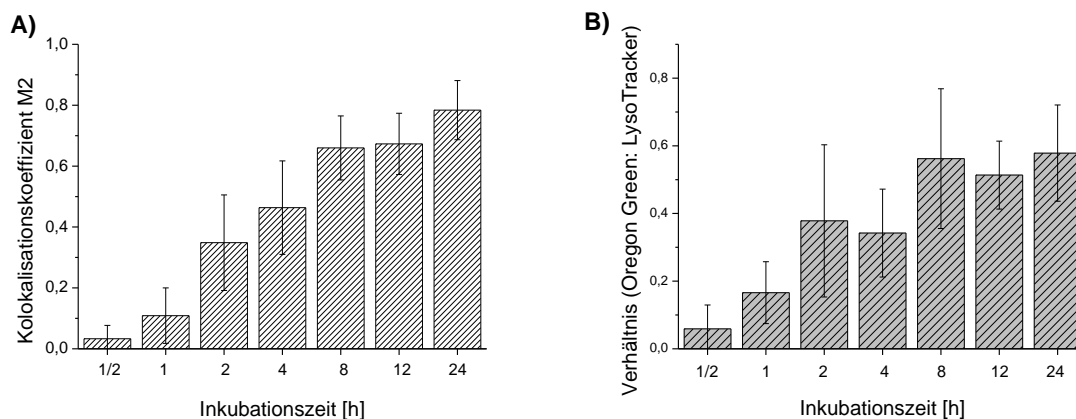
Abbildung 70: CLSM-Aufnahme von HeLa-Zellen nach 12 h Inkubation mit NHP1, welcher mit siRNA (nicht markiert) beladen war. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Nach 12 h war ebenfalls deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Partikel in Lysosomen vorlagen, was ebenfalls aufgrund der Kolokalisation der Fluoreszenzsignale der Marker für Lysosomen und Partikel festgestellt werden konnte. Eine Beladung mit siRNA beeinflusste damit nicht die Aufnahme der Partikel in Zellen.

#### 5.3.4 Quantitative Auswertung der Kinetik mit Volocity®

Wie unter 5.3.3 bereits erwähnt, wurde die Anreicherung der Partikel **NHP1** in Lysosomen quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde ebenfalls das Programm Volocity® verwendet, welches schon aus den bereits diskutierten Studien bekannt ist. Neben der Ermittlung des

Kolokalisationskoeffizienten „Manders' Coefficient“ M2, welcher sich auf das LysoTracker®-Signal bezieht und angibt, wie gut das Signal der Partikel mit dem Signal der Lysosomen überlappt (bzw. kolokalisiert), wurde auch das Verhältnis der Partikel zu Lysosomen bestimmt (Abbildung 71). Für die Analyse wurden mindestens 10 Zellen pro Inkubationszeit ausgewertet. Bei dieser Analyse wurde angenommen, dass das Signal des LysoTrackers® stets konstant blieb aufgrund der gleichbleibenden Probenpräparation (Vergleich: gleichbleibendes MitoTracker®-Signal aus Kapitel 5.1.3).



**Abbildung 71: Quantifizierung der Kolokalisation durch Berechnen des Kolokalisationskoeffizienten „Manders' Coefficient“ M2 (A)), welcher wiedergibt, wie viel und wie gut das Fluoreszenz-Signal von Oregon Green mit dem LysoTracker®-Signal überlappt. Das Verhältnis (B) der ermittelten Signale beider Farbstoffe beschreibt die Anreicherung des mit Oregon Green markierten Partikels NHP1 in Lysosomen.**

Anhand des Anstiegs des Kolokalisationskoeffizienten M2 (Abbildung 71, A) über die Dauer der Inkubationszeit kann man ablesen, dass immer mehr Partikel in die Lysosomen gelangten, je länger inkubiert wurde, da das Oregon Green-Signal der Partikel immer besser mit dem LysoTracker®-Signal der Lysosomen überlappte. Der optische Eindruck aus Abbildung 69 konnte also mittels Bildanalyse bestätigt werden und es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Partikel **NHP1** in Lysosomen akkumulierten. Als Bezugspunkt wurde diesmal das gleichbleibende Fluoreszenzsignal des LysoTrackers® gewählt, da auch hier bei jeder Inkubationszeit die gleiche Probenvorbereitung erfolgte, einschließlich der Markierung der Lysosomen.

Abbildung 71, B) gibt das Verhältnis der Fluoreszenzsignale beider Fluorophore wieder, woraus sich schließen lässt, dass die Anzahl der Partikel über die Dauer der Inkubationszeit anstieg. Es wurden also bis zu 8 h Inkubation immer mehr Partikel aufgenommen, danach scheint eine Sättigung eingetreten zu sein, da sich das Verhältnis nicht mehr signifikant

geändert hat. Beide Diagramme unterstützen also die getroffenen Aussagen aus Kapitel 5.3.3.

### 5.3.5 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide als Modellsystem für siRNA

Um zu zeigen, dass ein bislang ausbleibender Knockdown mit **NHP1** nicht daran lag, dass siRNA nach ihrer Komplexbildung nicht mehr aus den Partikeln freigesetzt werden konnte, sind Versuche mit den aus Kapitel 5.1 bereits bekannten Cy5-Oligos durchgeführt worden. Die Entscheidung, Cy5-Oligos zu verwenden, lag in der Tatsache begründet, dass diese sich bei Freisetzung an Mitochondrien anlagern, was sich sehr effektiv detektieren lässt.<sup>181</sup>

Dazu wurden HeLa-Zellen 24 h mit **NHP1** inkubiert, die zuvor mit Cy5-Oligos beladen wurden. Die Beladung erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie die Komplexbildung von siRNA in Nanohydrogelpartikeln, die zuvor unter 5.3.3 beschrieben wurde. Das Massenverhältnis von 25:1 (Partikel: Cy5-Oligo) konnte ebenfalls beibehalten werden, welches wie schon bei 5.3.3 mittels Gelelektrophorese überprüft wurde (durchgeführt von Lutz Nuhn). Auf die Markierung der Lysosomen mittels LysoTracker® Red wurde aus Übersichtsgründen in den CLSM-Aufnahmen verzichtet. Es konnte aus der vorhergehenden Kinetikstudie eindeutig gezeigt werden, dass sich nahezu alle Partikel nach 8 h in Lysosomen befanden.

In Abbildung 72 sind eindeutig die bereits bekannten fädigen Strukturen der Mitochondrien zu erkennen, die durch die Anlagerung der Cy5-Oligos markiert wurden.

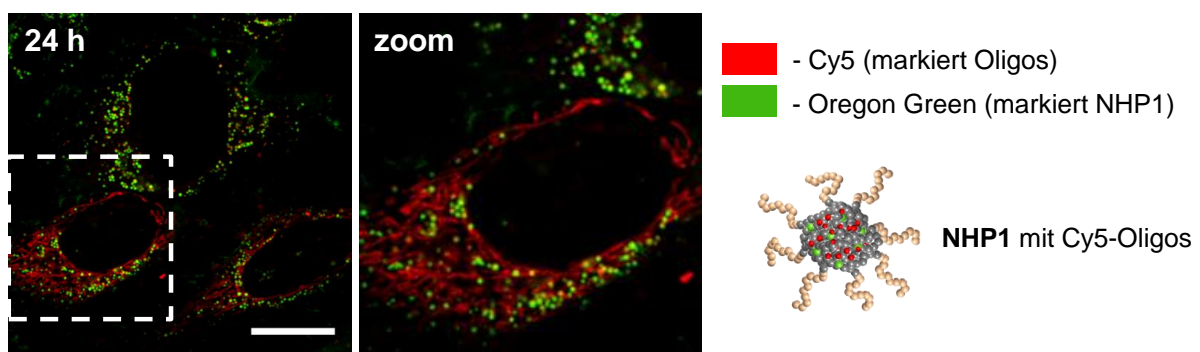


Abbildung 72: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit **NHP1**, die **Cy5-Oligos** enthielten. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Dies lässt die Annahme zu, dass eine Freisetzung der Oligonukleotide aus den Nanohydrogelpartikeln **NHP1** erfolgt sein musste. Die verwendete siRNA aus den

Knockdown-Studien aus Nuhn *et al.*<sup>179</sup> weist mit ihren 22 Basenpaaren ähnliche Dimensionen wie die verwendeten Cy5-Oligos auf. Es kann rückgeschlossen werden, dass auch siRNA aus den Partikeln freigesetzt werden könnte und das Fehlen einer ausreichenden Knockdown-Effizienz darin begründet zu liegen scheint, dass die siRNA zum Beispiel zu schnell in Lysosomen abgebaut würde. Die Freisetzung der Oligonukleotide aus **NHP1** könnte auf die Theorie eines Verdrängungsmechanismus zurückgeführt werden, der schon unter 5.3.1 angesprochen wurde.

### 5.3.6 Wiederholung der Kinetikstudie mit Partikeln, die Knockdown aufwiesen

Aus weitergeführten Studien mit kleineren Partikeln **NHP2**, die etwa nur halb so groß wie **NHP1** waren, aber in ihrem Aufbau diesen glichen, konnte Knockdown in Zellexperimenten festgestellt werden (durchgeführt von Lutz Nuhn). Diese Tatsache wurde zum Anlass genommen, um die gleichen Kinetikstudien zu betreiben, die auch mit **NHP1** durchgeführt wurden, um zu erfahren, ob ein tendenzieller Unterschied in der Anreicherung in Lysosomen zu detektieren ist.

Dafür wurden HeLa-Zellen ebenfalls  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4, 8, 12 und 24 h mit **NHP2** inkubiert, im Anschluss die Lysosomen mit LysoTracker® Red markiert und am CLSM nach den entsprechenden Inkubationszeiten und nach Anfärben der Zellmembranen mit CellMask™ Deep Red detektiert.

Vergleicht man die CLSM-Aufnahmen aus Abbildung 73 mit denen aus Abbildung 69, so können Unterschiede festgestellt werden. Schon nach einer halben Stunde Inkubation mit **NHP2** konnten im Vergleich zu **NHP1** viele Partikel in den Zellen detektiert werden. Die größeren Partikel aus der vorhergehenden Kinetikstudie konnten erst nach 2 h Inkubation deutlich detektiert werden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die kleineren Partikel **NHP2** im Vergleich zu den größeren schneller aufgenommen werden. Wurde bei den größeren Partikeln **NHP1** nach 8 h fast jeder Partikel in Lysosomen detektiert, so erkennt man in den Aufnahmen aus Abbildung 73 noch deutlich voneinander unabhängig zu detektierende Signale von markierten Lysosomen und Oregon Green-markierten Partikeln. Diese nicht kolocalisierenden Signale beider Fluorophore (LysoTracker® Red und Oregon Green) konnten bis zur letzten Inkubationszeit von 24 h detektiert werden. Man kann anhand der CLSM-Aufnahmen darauf schließen, dass die verwendeten kleineren Partikel **NHP2** im Vergleich zu den größeren Partikeln **NHP1** langsamer in Lysosomen aufgenommen werden. Außerdem kann man vermuten, dass mehr kleinere Partikel im Vergleich zu den größeren außerhalb von Lysosomen vorzufinden waren.

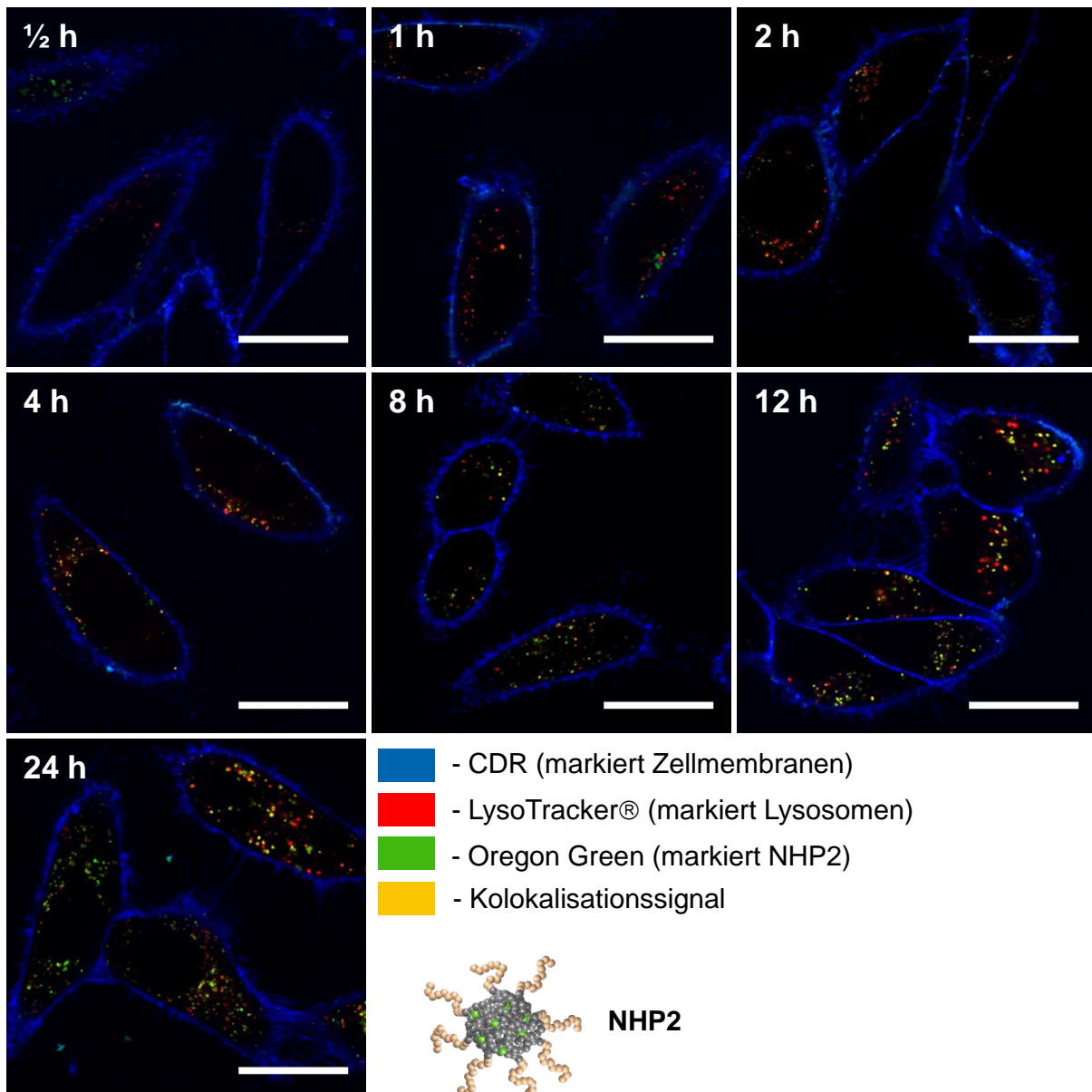
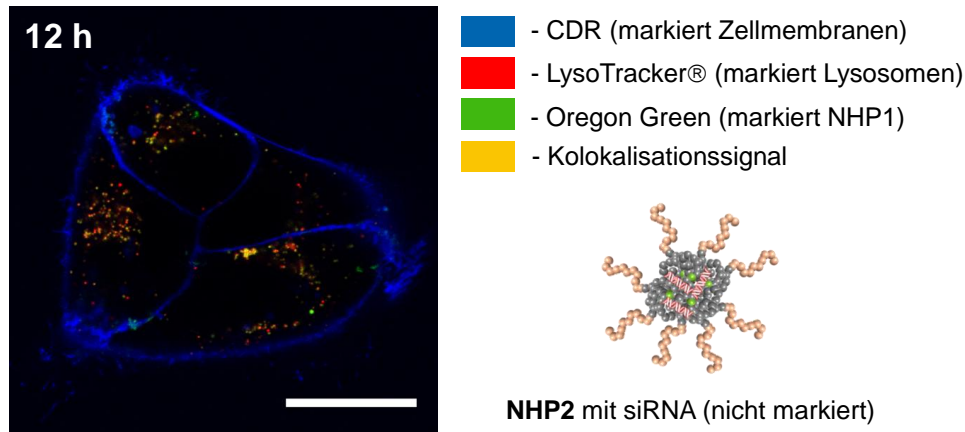


Abbildung 73: CLSM-Aufnahmen der Kinetikstudie mit NHP2 in HeLa-Zellen. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

Die Annahme, dass verstärkt Partikel, auch nach der längsten Inkubationszeit von 24 h, nicht in Lysosomen vorlagen, kann erklären, warum mit siRNA-beladenen **NHP2**-Proben Knockdown hervorgerufen werden konnte. Obwohl sich bereits schon viele Partikel bei kurzen Inkubationszeiten in Lysosomen befinden würden, was zum Abbau der siRNA führte, stünden noch genügend Partikel mit intakter siRNA zu Verfügung, die noch nicht in Lysosomen, sondern in Endosomen vorlägen und dort nach dem vorgeschlagenen Verdrängungsmechanismus die siRNA freisetzen könnten.

Der Partikel **NHP2** wurde ebenfalls mit siRNA beladen und am CLSM überprüft, ob sich das gleiche Aufnahmeverhalten des beladenen Partikels detektieren lässt. Die Vorgehensweise

zur Komplexierung der siRNA verlief dabei analog zu der Beladung von **NHP1** aus Kapitel 5.3.2. Abbildung 74 zeigt eine CLSM-Aufnahme als repräsentatives Beispiel nach 12 h Inkubation von HeLa-Zellen mit siRNA-beladenen Partikeln **NHP2**. Eine Beladung mit siRNA schien, wie auch schon bei den größeren Partikeln, keinen Einfluss auf das Aufnahmeverhältnis zu haben. Die Partikel wurden gut aufgenommen und lagen nach 12 h nur teilweise in Lysosomen vor.



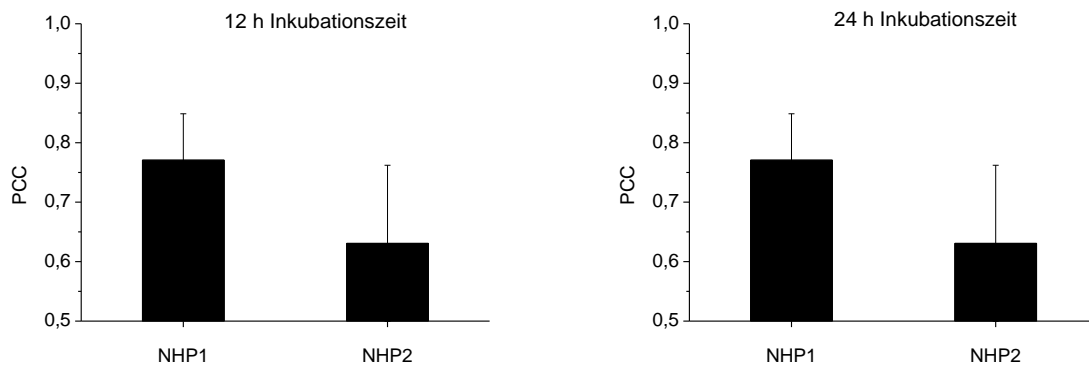
**Abbildung 74: CLSM-Aufnahme von HeLa-Zellen nach 12 h Inkubation mit NHP2, welcher mit siRNA (nicht markiert) beladen war. Der Farbcode ist in der Legende dargestellt. Der Größenbalken beträgt 25 µm.**

Um den optischen Eindruck quantitativ zu untersuchen, wurde auch in dieser Studie eine Auswertung der mikroskopischen Daten des unbeladenen Partikels mittels Volocity® angeschlossen.

### 5.3.7 Quantitative Auswertung der zweiten Kinetikstudie einschließlich Vergleich beider Studien mittels Volocity®

Für die Partikel **NHP1** und **NHP2** wurden im Vergleich quantitative Kolokalisationsanalysen durchgeführt, um die Eindrücke der CLSM-Aufnahmen beider Kinetikstudien (Abbildung 69 und Abbildung 73) im Hinblick auf einen Unterschied in der lysosomalen Anreicherung bestätigen zu können. Dabei wurde der Kolokalkulationskoeffizient nach Pearson (Pearson's Colocalization Coefficient, PCC) mittels Volocity® anhand von 10 Einzelzellen pro Partikel für die längeren Inkubationszeiten 12 h und 24 h ausgewertet. Der Fokus wurde auf die längeren Inkubationszeiten gelegt, da ein möglicher Unterschied der Partikelanreicherung in Lysosomen bei diesen Zeiten auch einen Knockdown erklären könnte. Abbildung 75 zeigt die gemittelten Werte aus 10 Einzelzellen pro Inkubationszeit für beide Partikel im Vergleich. Die

Analyse der Kolo­kalisierung bezog sich dabei auf die durch LysoTracker® Red ange­färbten Lysosomen und die Oregon Green-markierten Partikel. Liegen die Fluorophore kolo­kalisier­te vor, so ist ein hoher PCC zu erwarten, was wiederum bedeutet, dass die Partikel in Lysosomen vorliegen.

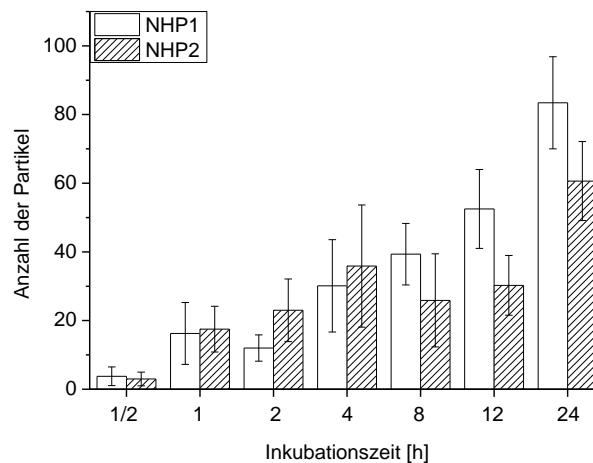


**Abbildung 75: Quantitative Kolo­kalisationsanalyse anhand des Kolo­kalisationskoeffizienten PCC hinsichtlich der Anreicherung der Nanohydrogel­partikel NHP1 und NHP2 in Lysosomen nach 12 h und 24 h Inkubation in HeLa-Zellen ( $n(\text{Zellen}) = 10$ ).**

Die gemittelten Werte des Kolo­kalisationskoeffizienten PCC waren für die kleineren Partikel **NHP2** im Vergleich zu den größeren Partikeln **NHP1** deutlich herabgesetzt. Das bedeutet, dass sich die 40 nm großen Partikel **NHP2** nach 12 h und 24 h weniger in Lysosomen angereichert haben als die 100 nm großen Partikel **NHP1**. Dies lässt darauf schließen, dass die kleineren Partikel über einen Aufnahmeweg in Zellen gelangten, welcher nicht zur Anreicherung in Lysosomen führte. Würden jedoch im zeitlichen Verlauf der Kinetik vermehrt kleine Partikel im Vergleich zu den großen Partikeln aufgenommen werden, wären auch immer noch genügend kleine Partikel vorhanden, die nicht in Lysosomen vorliegen würden, was dadurch zu niedrigeren PCC-Werten führen würde.

Da möglicherweise eine unterschiedlich starke/ schnelle Aufnahme der verschieden großen Partikel zugrunde liegt, wurde zusätzlich die Anzahl der Partikel **NHP1** und **NHP2** aus beiden Kinetikstudien für alle Zeitpunkte anhand von jeweils 10 ausgewerteten Zellen gegenübergestellt, um auszuschließen, dass die quantitative Kolo­kalisationsanalyse verfälscht wurde. Für die Bestimmung der Partikelanzahl wurden die Fluoreszenz-Spots der Oregon Green-markierten Nanohydrogel­partikel **NHP1** und **NHP2** mittels Volocity® ausgewertet, wobei darauf geachtet wurde, nur das Zellinnere zu analysieren, so dass an der Zellmembran anhaftende Partikel das Ergebnis nicht verfälschen konnten. Diese Auswertestrategie ist im Wesentlichen die gleiche, die schon unter 5.2.7 verwendet wurde.

Abbildung 76 zeigt die quantitative Analyse der Partikelaufnahme in HeLa-Zellen nach ½, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 h, wobei die Anzahl der Fluoreszenz-Spots zum besseren Verständnis der Anzahl an Partikeln gleichgesetzt wurde. Es sei allerdings vermerkt, dass die Spots vermutlich keine Einzelpartikel darstellen, sondern intrazelluläre Kompartimente, die mehrere Partikel enthalten.



**Abbildung 76: Quantitative Analyse der intrazellulären Partikelanzahl von NHP1 und NHP2 in HeLa-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten ( $n(\text{Zellen}) = 10$ ).**

Die Anzahl der aufgenommenen Partikel wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die Aufnahme erfolgte mit gleicher Effizienz, wobei bei beiden Partikeln eine Zunahme der Aufnahme bei längeren Inkubationszeiten zu verzeichnen war. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedlich starke bzw. unterschiedlich schnelle Aufnahme der Partikel **NHP1** und **NHP2** der Grund für die verschieden starke Anreicherung in Lysosomen war.

Abschließend kann gesagt werden, dass sich die intrazelluläre Verteilung der unterschiedlich großen Partikel stark unterscheidet. Die größeren Partikel **NHP1** wurden schon nach 4 h nahezu vollständig in Lysosomen angereichert, wobei eine Anreicherung der kleineren Partikel **NHP2** in diese Kompartimente sogar nach 24 h eher umgangen wurde. Somit kann die erhöhte Verweildauer der kleineren Partikel in nicht-lysosomalen Kompartimenten als Grund angesehen werden, weshalb mit diesen Partikeln ein Knockdown erzielt wurde, wenn eine siRNA-Beladung zuvor erfolgt war. Durch das Umgehen des endolysosomalen Aufnahmewegs kann ein Abbau der siRNA durch lysosomale Enzyme vermieden und eine Freisetzung ins Zytoplasma gefördert werden, wodurch die siRNA effizienter für einen Knockdown genutzt werden kann.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, wie man das Potential nanopartikulärer Systeme, die vorwiegend *via* Miniemulsion hergestellt wurden, im Hinblick auf „Drug Delivery“ ausnutzen könnte, indem ein Wirkstoffmodell auf unterschiedliche Art und Weise intrazellulär freigesetzt wurde. Dies wurde hauptsächlich mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) in Kombination mit dem Bildbearbeitungsprogramm Volocity® analysiert.

PBCA-Nanokapseln eigneten sich besonders, um hydrophile Substanzen wie etwa Oligonukleotide zu verkapseln und sie so auf ihrem Transportweg in die Zellen vor einem etwaigen Abbau zu schützen. Es konnte eine Freisetzung der Oligonukleotide in den Zellen aufgrund der elektrostatischen Anziehung des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden. Dabei war die Kombination aus Oligonukleotid und angebundenem Cyanin-Farbstoff (Cy5) an der 5'-Position der Oligonukleotid-Sequenz ausschlaggebend. Durch quantitative Analysen mittels Volocity® konnte die vollständige Kollokalisierung der freigesetzten Oligonukleotide an Mitochondrien bewiesen werden, was anhand der Kollokalisationskoeffizienten „Manders' Coefficients“ M1 und M2 diskutiert wurde. Es konnte ebenfalls aufgrund von FRET-Studien doppelt markierter Oligos gezeigt werden, dass die Oligonukleotide weder beim Transport noch bei der Freisetzung abgebaut wurden. Außerdem wurde aufgeklärt, dass nur der Inhalt der Nanokapseln, d. h. die Oligonukleotide, an Mitochondrien akkumulierte, das Kapselmaterial selbst jedoch in anderen intrazellulären Bereichen aufzufinden war. Eine Kombination aus Cyanin-Farbstoffen wie Cy5 mit einer Nukleotidsequenz oder einem Wirkstoff könnte also die Basis für einen gezielten Wirkstofftransport zu Mitochondrien liefern bzw. die Grundlage schaffen, eine Freisetzung aus Kapseln ins Zytoplasma zu gewährleisten.

Der vielseitige Einsatz der Miniemulsion gestattete es, nicht nur Kapseln sondern auch Nanopartikel herzustellen, in welchen hydrophobe Substanzen im Partikelkern eingeschlossen werden konnten. Diese auf hydrophobe Wechselwirkungen beruhende „Verkapselung“ eines Wirkstoffmodells, in diesem Fall PMI, wurde bei PDLLA- bzw. PS-Nanopartikeln ausgenutzt, welche durch ein HPMA-basiertes Block-Copolymer stabilisiert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das hydrophobe Wirkstoffmodell PMI innerhalb kürzester Zeit in die Zellen freigesetzt wurde und sich in sogenannte „Lipid Droplets“ einlagerte, ohne dass die Nanopartikel selbst aufgenommen werden mussten. Daneben war ein intrazelluläres Ablösen des stabilisierenden Block-Copolymers zu verzeichnen, welches 8 h nach Partikelaufnahme erfolgte und ebenfalls durch Analysen mittels Volocity® untermauert wurde. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die eigentliche Partikelaufnahme oder die Freisetzung des Wirkstoffmodells. Ein großer Vorteil in der Verwendung des HPMA-basierten Block-Copolymers liegt darin begründet, dass auf zeitaufwendige Waschschr

wie etwa Dialyse nach der Partikelherstellung verzichtet werden konnte, da P(HPMA) ein biokompatibles Polymer ist. Auf der anderen Seite hat man aufgrund der Syntheseroute dieses Block-Copolymers vielfältige Möglichkeiten, Funktionalitäten wie etwa Fluoreszenzmarker einzubringen. Eine kovalente Anbindung eines Wirkstoffs ist ebenfalls denkbar, welcher intrazellulär z. B. aufgrund von enzymatischen Abbauprozessen langsam freigesetzt werden könnte. Somit bietet sich die Möglichkeit mit Nanopartikeln, die durch HPMA-basierte Block-Copolymere stabilisiert wurden, gleichzeitig zwei unterschiedliche Wirkstoffe in die Zellen zu bringen, wobei der eine schnell und der zweite über einen längeren Zeitraum hinweg (kontrolliert) freigesetzt werden könnte.

Neben Nanokapseln sowie -partikeln, die durch inverse bzw. direkte Miniemulsion dargestellt wurden, sind auch Nanohydrogelpartikel untersucht worden, die sich aufgrund von Selbstorganisation eines amphiphilen Block-Copolymers bildeten. Diese Nanohydrogelpartikel dienten der Komplexierung von siRNA und wurden hinsichtlich ihrer Anreicherung in Lysosomen untersucht. Aufgrund der Knockdown-Studien von Lutz Nuhn konnte ein Unterschied in der Knockdown-Effizienz festgestellt werden, je nach dem, ob 100 nm oder 40 nm große Nanohydrogelpartikel verwendet wurden. Es sollte festgestellt werden, ob eine größenbedingte, unterschiedlich schnelle Anreicherung dieser beiden Partikel in Lysosomen erfolgte, was die unterschiedliche Knockdown-Effizienz erklären könnte. CLSM-Studien und quantitative Kollokalisationsstudien gaben einen ersten Hinweis auf diese Größenabhängigkeit.

Bei allen verwendeten nanopartikulären Systemen konnte eine Freisetzung ihres Inhalts gezeigt werden. Somit bieten sie ein großes Potential als Wirkstoffträger für biomedizinische Anwendungen.

## 7 Summary

During this PhD thesis nanoparticulate systems (mainly obtained *via* miniemulsion process) were investigated in terms of their potential application as drug delivery systems for biomedical applications. Therefore different possibilities of drug release were analyzed using confocal laser scanning microscopy (CLSM) in combination with an image processing program called Volocity®.

PBCA nanocapsules are perfectly suitable for encapsulation of hydrophilic substances like oligonucleotides preventing their degradation during their transport into cells. An intracellular degradation could also be avoided, which was shown by FRET measurements of double labeled oligonucleotides outside and inside cells. An intracellular release based on the electrostatic interaction of the mitochondrial membrane potential and the Cy5-labeled oligonucleotide was demonstrated by measurements with the uncoupler DNP. The special combination of a cyanine-dye labeling an oligonucleotide in 5'-position was found to be crucial for those, previously mentioned interactions. Quantitative analysis with Volocity® brought evidence that all released oligonucleotides accumulated on mitochondria, which was indicated by the colocalization coefficients M1 and M2. Furthermore it was demonstrated that capsules' material remained in other intracellular compartments than their released payload. It can be summarized that a combination of cyanine-dye like Cy5 and a sequence of nucleotides or also a drug offers an opportunity to deliver these payloads exclusively to mitochondria.

The versatile applicability of the miniemulsion process was utilized not only for the generation of capsules containing a hydrophilic payload but also for the creation of polymeric particles bearing hydrophobic substances inside their polymeric matrix due to hydrophobic interactions. Polystyrene as well as PDLLA nanoparticles were synthesized using the miniemulsion solvent-evaporation technique. The applied HPMA-based block copolymer served as a colloidal stabilizing-agent in the synthesis process and replaced the commonly used surfactant SDS. PMI was "incorporated" inside the polymeric particles during the particle formation procedure and represents a model system for hydrophobic drugs. The generated nanoparticles could be used without further purification in uptake studies due to the non-cytotoxic behavior of the surface-active block copolymers, which is of advantage in comparison to SDS-stabilized particles. Applying the polymer nanoparticle in cell experiments, it occurred that PMI was released very fast into cells and accumulated in so called "lipid droplets", even before the actual cellular uptake of nanoparticles. Further studies with double labeled nanoparticles showed an intracellular detachment of the HPMA-based block copolymer 8 h after particle uptake. An independent detection of both, the particles' core and the stabilizing block copolymer was ensured by labeling both with a covalently

bound fluorophore. These findings were also supported by image analysis with Velocity®. In general it would be possible to incorporate two different drugs in a nanoparticle. One in the hydrophobic core which will be released fast, and one covalently bound to the stabilizing block copolymer which will show a (controlled) release over a longer time after enzymatic degradation, for instance.

Besides dealing with nanocapsules and nanoparticle prepared by inverse or direct miniemulsion methods also nanohydrogel particles which were obtained by self assembly of an amphiphilic block copolymer were investigated with regard to their uptake behavior and accumulation in lysosomes. The particles were able to enrich their core with siRNA based on electrostatic attraction forces. Due to knock down studies performed by Lutz Nuhn, a difference in the knock down efficiency was found which seemed to be particle size dependent. Kinetic studies of the particle uptake in HeLa were conducted to elucidate whether there is a relation between the particle size and the accumulation of particles in lysosomes. Such accumulation may be responsible for the degradation of siRNA which influences the knock down. Therefore, nanohydrogel particles with a size of 100 and 40 nm respectively were applied in cell experiments investigating their uptake by CLSM. Those CLSM-images gave a hint that there is indeed a faster enrichment of bigger particles in lysosomes in comparison to smaller ones, so that the absence of knock down might be explained by a faster degradation of siRNA which was incorporated in bigger particles.

Every nanoparticulate system investigated in this work showed a release of cargo. Thus, these systems have a high potential for their application as drug delivery systems.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CDR	CellMask™ Deep Red (Zellmembranfarbstoff)
CLSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNP	Dinitrophenol (Entkoppler)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
FCS	fötales Kälberserum ( <i>engl.</i> : fetal calf serum)
FRET	Fluoreszenz-(Förster)-Resonanzenergietransfer
HPMA	Hydroxypropylmethacrylamid
IR	Infrarot
LMA	Laurylmethacrylat
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Salz
MWCO	Porengröße der Membran ( <i>engl.</i> : molecular weight cut off)
PBCA	Poly( <i>n</i> -butylcyanacrylat)
PFA	Formaldehydlösung, die aus Paraformaldehyd gewonnen wurde
PMI	Perylenmonoimid ( <i>N</i> -(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid)
PMT	Sekundärelektronenvervielfacher ( <i>engl.</i> : photomultiplier tube)
PPCA	Poly(propargylcyanacrylat)
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation ( <i>engl.</i> reversible addition-fragmentation chain transfer)
REM	Rasterelektronenmikroskopie

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TM	Transmission
UV	Ultraviolett

## 8.2 Symbole

$\lambda$	Wellenlänge
$\zeta$	Zeta-Potential
$d$	Hydrodynamischer Durchmesser
M1	Manders' Coefficient (bezogen auf Fluorophor 1)
M2	Manders' Coefficient (bezogen auf Fluorophor 2)
PCC	Pearson's Correlation Coefficient

## 9 Literaturverzeichnis

1. 10 Jahre Forschung Zu Risikobewertung, Human- Und Ökotoxikologie Von Nanomaterialien. DECHEMA/VCI-Arbeitskreis "Responsible Production and Use of Nanomaterials": 2011.
2. NanoCare, Gesundheitsrelevante Aspekte Synthetischer Nanomaterialien. 2009.
3. <http://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/industrieruss/materialinfo-industrieruss>.
4. <http://www.zeit.de/2013/45/nanotechnologie-lebensmittel>.
5. Gonsalves, K. E., *Biomedical Nanostructures*. Wiley: 2008.
6. Hogle, J. M.; Chow, M.; Filman, D. J., 3-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution. *Science* **1985**, *229*, 1358-1365.
7. Sapp, M.; Bienkowska-Haba, M., Viral Entry Mechanisms: Human Papillomavirus and a Long Journey from Extracellular Matrix to the Nucleus. *Febs J* **2009**, *276*, 7206-7216.
8. Mercer, J.; Helenius, A., Virus Entry by Macropinocytosis. *Nature Cell Biology* **2009**, *11*, 510-520.
9. Iversen, T. G.; Skotland, T.; Sandvig, K., Endocytosis and Intracellular Transport of Nanoparticles: Present Knowledge and Need for Future Studies. *Nano Today* **2011**, *6*, 176-185.
10. Lu, T. C.; Sun, J.; Chen, X. X.; Zhang, P. B.; Jing, X. B., Folate-Conjugated Micelles and Their Folate-Receptor-Mediated Endocytosis. *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, 1059-1068.
11. Farokhzad, O. C.; Cheng, J. J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Richie, J. P.; Langer, R., Targeted Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for Cancer Chemotherapy in Vivo. *P Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 6315-6320.
12. Kettler, K.; Veltman, K.; van de Meent, D.; van Wezel, A.; Hendriks, A. J., Cellular Uptake of Nanoparticles as Determined by Particle Properties, Experimental Conditions, and Cell Type. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2014**, *33*, 481-492.
13. de la Rica, R.; Aili, D.; Stevens, M. M., Enzyme-Responsive Nanoparticles for Drug Release and Diagnostics. *Adv Drug Deliver Rev* **2012**, *64*, 967-978.
14. Murphy, M. P.; Smith, R. A. J., Drug Delivery to Mitochondria: The Key to Mitochondrial Medicine. *Adv Drug Deliver Rev* **2000**, *41*, 235-250.
15. Webster, D. M.; Sundaram, P.; Byrne, M. E., Injectable Nanomaterials for Drug Delivery: Carriers, Targeting Moieties, and Therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *84*, 1-20.
16. Hirosue, S.; Muller, B. G.; Mulligan, R. C.; Langer, R., Plasmid DNA Encapsulation and Release from Solvent Diffusion Nanospheres. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70*, 231-242.
17. Makadia, H. K.; Siegel, S. J., Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers-Basel* **2011**, *3*, 1377-1397.

18. Ghosh, P. K., Hydrophilic Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. *Indian J Biochem Bio* **2000**, *37*, 273-282.
19. Besheer, A.; Vogel, J.; Glanz, D.; Kressler, J.; Groth, T.; Mader, K., Characterization of Plga Nanospheres Stabilized with Amphiphilic Polymers: Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Starch Vs Pluronics. *Mol Pharmaceut* **2009**, *6*, 407-415.
20. Marcovich, R.; Williams, A. L.; Rubin, M. A.; Wolf, J. S., Comparison of 2-Octyl Cyanoacrylate Adhesive, Fibrin Glue, and Suturing for Wound Closure in the Porcine Urinary Tract. *Urology* **2001**, *57*, 806-810.
21. El-Gazzar, Y.; Smith, D. C.; Kim, S. J.; Hirsh, D. M.; Blum, Y.; Cobelli, M.; Cohen, H. W., The Use of Dermabond (R) as an Adjunct to Wound Closure after Total Knee Arthroplasty: Examining Immediate Post-Operative Wound Drainage. *J Arthroplasty* **2013**, *28*, 553-556.
22. [http://www.henkel.de/marken-12248.htm?countryCode=de&BU=cons\\_crafts&parentredDotUID=0000000KF7&redDotUID=000000PLBM](http://www.henkel.de/marken-12248.htm?countryCode=de&BU=cons_crafts&parentredDotUID=0000000KF7&redDotUID=000000PLBM).
23. <http://www.ccs.neu.edu/home/feneric/cyanoacrylate.html#LeeGaensslen>.
24. Vauthier, C.; Dubernet, C.; Chauvierre, C.; Brigger, I.; Couvreur, P., Drug Delivery to Resistant Tumors: The Potential of Poly(Alkyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93*, 151-160.
25. Gipps, E. M.; Groscurth, P.; Kreuter, J.; Speiser, P. P., The Effects of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles on Human Normal and Malignant Mesenchymal Cells-Invitro. *Int J Pharm* **1987**, *40*, 23-31.
26. Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Couvreur, P., Poly(Alkylcyanoacrylates) as Biodegradable Materials for Biomedical Applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2003**, *55*, 519-548.
27. Lherm, C.; Muller, R. H.; Puisieux, F.; Couvreur, P., Alkylcyanoacrylate Drug Carriers .2. Cytotoxicity of Cyanoacrylate Nanoparticles with Different Alkyl Chain-Length. *Int J Pharm* **1992**, *84*, 13-22.
28. Chouinard, F.; Kan, F. W. K.; Leroux, J. C.; Foucher, C.; Lenaerts, V., Preparation and Purification of Polyisohexylcyanoacrylate Nanocapsules. *Int J Pharm* **1991**, *72*, 211-217.
29. Lorenz, S. Interaktion Von Nanopartikeln Mit Immortalisierten Zelllinien Und Stammzellen. Dissertation, 2010.
30. Baier, G.; Musyanovych, A.; Landfester, K.; Best, A.; Lorenz, S.; Mailander, V., DNA Amplification Via Polymerase Chain Reaction inside Miniemulsion Droplets with Subsequent Poly(N-Butylcyanoacrylate) Shell Formation and Delivery of Polymeric Capsules into Mammalian Cells. *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11*, 1099-1109.
31. Gulyaev, A. E.; Gelperina, S. E.; Skidan, I. N.; Antropov, A. S.; Kivman, G. Y.; Kreuter, J., Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles. *Pharm Res-Dord* **1999**, *16*, 1564-1569.
32. O'Sullivan, C.; Birkinshaw, C., Hydrolysis of Poly (N-Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Using Esterase. *Polym Degrad Stabil* **2002**, *78*, 7-15.



33. Obereigner, B.; Buresova, M.; Vrana, A.; Kopecek, J., Preparation of Polymerizable Derivatives of N-(4-Aminobenzenesulfonyl)-N'-Butylurea. *J Polym Sci Pol Sym* **1979**, 41-52.
34. Ringsdorf, H., Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J Polym Sci Pol Sym* **1975**, 135-153.
35. Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J., Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Pk1 [N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents-Drug-Polymer Conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin Cancer Res* **1999**, 5, 83-94.
36. Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Kerr, D. J.; Rea, D.; Whitlock, M.; Poyner, R.; Boivin, C.; Hesslewood, S.; Twelves, C.; Blackie, R.; Schatzlein, A.; Jodrell, D.; Bissett, D.; Calvert, H.; Lind, M.; Robbins, A.; Burtles, S.; Duncan, R.; Cassidy, J., Phase II Studies of Polymer-Doxorubicin (Pk1, Fce28068) in the Treatment of Breast, Lung and Colorectal Cancer. *Int J Oncol* **2009**, 34, 1629-36.
37. Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J., Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin. *J Clin Oncol* **2002**, 20, 1668-76.
38. Nowotnik, D. P.; Cvitkovic, E., Prolindac (Ap5346): A Review of the Development of an Hpma Dach Platinum Polymer Therapeutic. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, 61, 1214-9.
39. Sprincl, L.; Exner, J.; Sterba, O.; Kopecek, J., New Types of Synthetic Infusion Solutions. Iii. Elimination and Retention of Poly-[N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide] in a Test Organism. *J Biomed Mater Res* **1976**, 10, 953-63.
40. Wang, D.; Miller, S. C.; Shlyakhtenko, L. S.; Portillo, A. M.; Liu, X. M.; Papangkorn, K.; Kopeckova, P.; Lyubchenko, Y.; Higuchi, W. I.; Kopecek, J., Osteotropic Peptide That Differentiates Functional Domains of the Skeleton. *Bioconjug Chem* **2007**, 18, 1375-8.
41. Liu, X. M.; Quan, L. D.; Tian, J.; Alnouti, Y.; Fu, K.; Thiele, G. M.; Wang, D., Synthesis and Evaluation of a Well-Defined Hpma Copolymer-Dexamethasone Conjugate for Effective Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Pharm Res* **2008**, 25, 2910-9.
42. Kopecek, J.; Kopeckova, P., Hpma Copolymers: Origins, Early Developments, Present, and Future. *Adv Drug Deliver Rev* **2010**, 62, 122-149.
43. Duncan, R.; Vicent, M. J., Do Hpma Copolymer Conjugates Have a Future as Clinically Useful Nanomedicines? A Critical Overview of Current Status and Future Opportunities. *Adv Drug Deliver Rev* **2010**, 62, 272-282.
44. Cuchelkar, V.; Kopeckova, P.; Kopecek, J., Synthesis and Biological Evaluation of Disulfide-Linked Hpma Copolymer-Mesochlorin E6 Conjugates. *Macromol Biosci* **2008**, 8, 375-83.
45. Shiah, J. G.; Dvorak, M.; Kopeckova, P.; Sun, Y.; Peterson, C. M.; Kopecek, J., Biodistribution and Antitumour Efficacy of Long-Circulating N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymer-Doxorubicin Conjugates in Nude Mice. *Eur J Cancer* **2001**, 37, 131-9.
46. Datenblatt. Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 2009.

47. Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L., Direct, Controlled Synthesis of the Nonimmunogenic, Hydrophilic Polymer, Poly(N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide) Via Raft in Aqueous Media. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1846-50.
48. Convertine, A. J.; Benoit, D. S. W.; Duvall, C. L.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S., Development of a Novel Endosomolytic Diblock Copolymer for Sirna Delivery. *Journal of Controlled Release* **2009**, *133*, 221-229.
49. Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Living Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (the Life of Raft). *Polym Int* **2000**, *49*, 993-1001.
50. Kelsch, A. Synthese Und *in Vitro* Evaluierung Von Biokompatiblen Nanopartikeln Mittels Hpma-Basierten Tensiden. Diplomarbeit, 2011.
51. Batz, H. G.; Franzman, G.; Ringsdor, H., Model Reactions for Synthesis of Pharmacologically Active Polymers by Way of Monomeric and Polymeric Reactive Esters. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1972**, *11*, 1103-1104.
52. Theato, P., Synthesis of Well-Defined Polymeric Activated Esters. *J Polym Sci Pol Chem* **2008**, *46*, 6677-6687.
53. Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T. P.; Bulmus, V., In Vitro Cytotoxicity of Raft Polymers. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412-20.
54. Cascone, M. G.; Barbani, N.; Cristallini, C.; Giusti, P.; Ciardelli, G.; Lazzeri, L., Bioartificial Polymeric Materials Based on Polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed* **2001**, *12*, 267-81.
55. Timmins, M. R.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C., Heterogeneous Kinetics of the Enzymatic Degradation of Poly(Beta-Hydroxyalkanoates). *Polymer* **1997**, *38*, 551-562.
56. Williams, D. F.; Zhong, S. P., Biodeterioration Biodegradation of Polymeric Medical Devices in-Situ. *Int Biodeter Biodegr* **1994**, *34*, 95-130.
57. Kulkarni, R. K.; Pani, K. C.; Neuman, C.; Leonard, F., Polylactic Acid for Surgical Implants. *Arch Surg* **1966**, *93*, 839-43.
58. Prokop, A., Neue Biodegradable Polylactid-Implantate (Polypin®-C) Zur Therapie Von Radiuskopffrakturen. In *Der Chirurg*, Springer: 2002; Vol. 73, pp 997-1004.
59. Mohamed-Hashem, I. K.; Mitchell, D. A., Resorbable Implants (Plates and Screws) in Orthognathic Surgery. *J Orthod* **2000**, *27*, 198-9.
60. Shive, M. S.; Anderson, J. M., Biodegradation and Biocompatibility of Pla and Plga Microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* **1997**, *28*, 5-24.
61. Han, T.; Utko, J.; Jerzykiewicz, L. B.; Sobota, P., Design of a Magnesium-Pridinolum Complex for Polylactide-Drug Conjugates Formation. *Dalton T* **2011**, *40*, 12660-12662.
62. Azevedo, H. S., Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. In *Biodegradable Systems in Medical Functions: Design, Processing, Testing and Applications*, CRC Press: 2004; pp 171-201.

63. Gopferich, A., Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103-14.
64. von Burkersroda, F.; Schedl, L.; Gopferich, A., Why Degradable Polymers Undergo Surface Erosion or Bulk Erosion. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4221-31.
65. Duncan, R., The Dawning Era of Polymer Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 347-60.
66. Duncan, R., Development of Hpmc Copolymer-Anticancer Conjugates: Clinical Experience and Lessons Learnt. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61*, 1131-48.
67. Holzapfel, V.; Musyanovych, A.; Landfester, K.; Lorenz, M. R.; Mailander, V., Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells. *Macromol Chem Phys* **2005**, *206*, 2440-2449.
68. Ekkapongpisit, M.; Giovia, A.; Follo, C.; Caputo, G.; Isidoro, C., Biocompatibility, Endocytosis, and Intracellular Trafficking of Mesoporous Silica and Polystyrene Nanoparticles in Ovarian Cancer Cells: Effects of Size and Surface Charge Groups. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 4147-58.
69. Hazra, C.; Arunbabu, D.; Kundu, D.; Chaudhari, A.; Jana, T., Biomimetic Fabrication of Biocompatible and Biodegradable Core-Shell Polystyrene/Biosurfactant Bionanocomposites for Protein Drug Release. *J Chem Technol Biot* **2013**, *88*, 1551-1560.
70. Davis, M. E., The First Targeted Delivery of SiRNA in Humans Via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol Pharmaceut* **2009**, *6*, 659-668.
71. Aderem, A.; Underhill, D. M., Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol* **1999**, *17*, 593-623.
72. Lian, T.; Ho, R. J. Y., Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci-US* **2001**, *90*, 667-680.
73. Upadhyay, K. K.; Le Meins, J. F.; Misra, A.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Ibarboure, E.; Schatz, C.; Lecommandoux, S., Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-Block-Poly(Gamma-Benzyl Glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2802-8.
74. Kurtoglu, Y. E.; Navath, R. S.; Wang, B.; Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R. M., Poly(Amidoamine) Dendrimer-Drug Conjugates with Disulfide Linkages for Intracellular Drug Delivery. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2112-2121.
75. Feazell, R. P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Lippard, S. J., Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes as Longboat Delivery Systems for Platinum(IV) Anticancer Drug Design. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 8438-+.
76. Mirza, A. Z.; Shamshad, H., Preparation and Characterization of Doxorubicin Functionalized Gold Nanoparticles. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 1857-60.
77. Hans, M. L.; Lowman, A. M., Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Curr Opin Solid St M* **2002**, *6*, 319-327.

78. Baier, G.; Baumann, D.; Siebert, J. M.; Musyanovych, A.; Mailander, V.; Landfester, K., Suppressing Unspecific Cell Uptake for Targeted Delivery Using Hydroxyethyl Starch Nanocapsules. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2704-2715.
79. Landfester, K., Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48*, 4488-4507.
80. Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M., Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222-5228.
81. Landfester, K., Recent Developments in Miniemulsions - Formation and Stability Mechanisms. *Macromol Symp* **2000**, *150*, 171-178.
82. Ugelstad, J.; Elaasser, M. S.; Vanderhoff, J., Emulsion Polymerization - Initiation of Polymerization in Monomer Droplets. *J Polym Sci Pol Lett* **1973**, *11*, 503-513.
83. Landfester, K., Polyreactions in Miniemulsions. *Macromol Rapid Comm* **2001**, *22*, 896-936.
84. de Faria, T. J.; de Campos, A. M.; Senna, E. L., Preparation and Characterization of Poly(D,L-Lactide) (PLA) and Poly(D,L-Lactide)-Poly(Ethylene Glycol) (PLA-Peg) Nanocapsules Containing Antitumoral Agent Methotrexate. *Macromol Symp* **2005**, *229*, 228-233.
85. Paiphansiri, U.; Tangboriboonrat, P.; Landfester, K., Polymeric Nanocapsules Containing an Antiseptic Agent Obtained by Controlled Nanoprecipitation onto Water-in-Oil Miniemulsion Droplets. *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6*, 33-40.
86. Allemann, E.; Leroux, J. C.; Gurny, R., Polymeric Nano- and Microparticles for the Oral Delivery of Peptides and Peptidomimetics. *Adv Drug Deliver Rev* **1998**, *34*, 171-189.
87. Sarkar, D.; El-Khoury, J.; Lopina, S. T.; Hu, J., An Effective Method for Preparing Polymer Nanocapsules with Hydrophobic Acrylic Shell and Hydrophilic Interior by Inverse Emulsion Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8603-8605.
88. Rosenbauer, E. M.; Landfester, K.; Musyanovych, A., Surface-Active Monomer as a Stabilizer for Polyurea Nanocapsules Synthesized Via Interfacial Polyaddition in Inverse Miniemulsion. *Langmuir* **2009**, *25*, 12084-12091.
89. Crespy, D.; Stark, M.; Hoffmann-Richter, C.; Ziener, U.; Landfester, K., Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets. *Macromolecules* **2007**, *40*, 3122-3135.
90. Gehrke, S. H., Synthesis, Equilibrium Swelling, Kinetics, Permeability and Applications of Environmentally Responsive Gels. *Advances in Polymer Science* **1993**, *110*, 81-144.
91. Hoffman, A. S., Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2002**, *54*, 3-12.
92. Saunders, B. R.; Vincent, B., Microgel Particles as Model Colloids: Theory, Properties and Applications. *Adv Colloid Interfac* **1999**, *80*, 1-25.
93. Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K., The Development of Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications. *Prog Polym Sci* **2008**, *33*, 448-477.
94. Jones, C. D.; Lyon, L. A., Synthesis and Characterization of Multiresponsive Core-Shell Microgels. *Macromolecules* **2000**, *33*, 8301-8306.

95. Suzuki, A.; Tanaka, T., Phase-Transition in Polymer Gels Induced by Visible-Light. *Nature* **1990**, *346*, 345-347.
96. Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., A Reversibly Antigen-Responsive Hydrogel. *Nature* **1999**, *399*, 766-769.
97. Ogawa, K.; Wang, B.; Kokufuta, E., Enzyme-Regulated Microgel Collapse for Controlled Membrane Permeability. *Langmuir* **2001**, *17*, 4704-4707.
98. Zhu, P. W.; Napper, D. H., Effect of Heating Rate on Nanoparticle Formation of Poly(N-Isopropylacrylamide)-Poly(Ethylene Glycol) Block Copolymer Microgels. *Langmuir* **2000**, *16*, 8543-8545.
99. Huang, H. Y.; Kowalewski, T.; Remsen, E. E.; Gertzmann, R.; Wooley, K. L., Hydrogel-Coated Glassy Nanospheres: A Novel Method for the Synthesis of Shell Cross-Linked Knedels. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 11653-11659.
100. Na, K.; Bae, Y. H., Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles Responsive to Tumor Extracellular Ph from Pullulan Derivative/Sulfonamide Conjugate: Characterization, Aggregation, and Adriamycin Release in Vitro. *Pharm Res-Dord* **2002**, *19*, 681-688.
101. Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V., Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48*, 5418-5429.
102. Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P., Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. *Adv Drug Deliver Rev* **2008**, *60*, 1638-1649.
103. Oishi, M.; Nagasaki, Y., Stimuli-Responsive Smart Nanogels for Cancer Diagnostics and Therapy. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 451-468.
104. Winter, R., *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*. Teubner: 1998.
105. Pawley, J. B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3 ed.; Springer: 2006.
106. Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M., FRET Imaging. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1387-1395.
107. Ting, A. Y.; Kain, K. H.; Klemke, R. L.; Tsien, R. Y., Genetically Encoded Fluorescent Reporters of Protein Tyrosine Kinase Activities in Living Cells. *P Natl Acad Sci USA* **2001**, *98*, 15003-15008.
108. Kraynov, V. S.; Chamberlain, C.; Bokoch, G. M.; Schwartz, M. A.; Slabaugh, S.; Hahn, K. M., Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells. *Science* **2000**, *290*, 333-337.
109. Alberts, B., *Lehrbuch Der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH: 1999.
110. Koolmann, J., *Taschenatlas Der Biochemie*. Thieme: 1994.
111. Conner, S. D.; Schmid, S. L., Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* **2003**, *422*, 37-44.
112. Zhao, F.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Chang, X. L.; Chen, C. Y.; Zhao, Y. L., Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small* **2011**, *7*, 1322-1337.

113. Jana, N. R., Design and Development of Quantum Dots and Other Nanoparticles Based Cellular Imaging Probe. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 385-396.
114. Mayor, S.; Pagano, R. E., Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2007**, *8*, 603-612.
115. Russell, D. G., Mycobacterium Tuberculosis: Here Today, and Here Tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2001**, *2*, 569-577.
116. Kontos, S.; Hubbell, J. A., Drug Development: Longer-Lived Proteins. *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 2686-2695.
117. Vollrath, A.; Schallon, A.; Pietsch, C.; Schubert, S.; Nomoto, T.; Matsumoto, Y.; Kataoka, K.; Schubert, U. S., A Toolbox of Differently Sized and Labeled Pmma Nanoparticles for Cellular Uptake Investigations. *Soft Matter* **2013**, *9*, 99-108.
118. Dausend, J.; Musyanovych, A.; Dass, M.; Walther, P.; Schrezenmeier, H.; Landfester, K.; Mailander, V., Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in Hela Cells. *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8*, 1135-1143.
119. Baumann, K. D. Nanopartikel Und Nanokapseln Als Potentielle Wirkstofftransportsysteme: Zelluläre Aufnahme in Leukozyten in Peripherem Vollblut Und in Zellkultur. Dissertation, 2012.
120. Meng, F. H.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. Y., Intracellular Drug Release Nanosystems. *Mater Today* **2012**, *15*, 436-442.
121. Rofstad, E. K.; Mathiesen, B.; Kindem, K.; Galappathi, K., Acidic Extracellular Ph Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice. *Cancer Res* **2006**, *66*, 6699-707.
122. Lomas, H.; Canton, I.; MacNeil, S.; Du, J.; Armes, S. P.; Ryan, A. J.; Lewis, A. L.; Battaglia, G., Biomimetic Ph Sensitive Polymersomes for Efficient DNA Encapsulation and Delivery. *Adv Mater* **2007**, *19*, 4238-+.
123. Bachelder, E. M.; Beaudette, T. T.; Broaders, K. E.; Dashe, J.; Frechet, J. M. J., Acetal-Derivatized Dextran: An Acid-Responsive Biodegradable Material for Therapeutic Applications. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 10494-+.
124. Wu, G. Y.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D., Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* **2004**, *134*, 489-492.
125. Kuppusamy, P.; Li, H. Q.; Ilangovan, G.; Cardounel, A. J.; Zweier, J. L.; Yamada, K.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., Noninvasive Imaging of Tumor Redox Status and Its Modification by Tissue Glutathione Levels. *Cancer Res* **2002**, *62*, 307-312.
126. Sun, H. L.; Guo, B. N.; Li, X. Q.; Cheng, R.; Meng, F. H.; Liu, H. Y.; Zhong, Z. Y., Shell-Sheddable Micelles Based on Dextran-Ss-Poly(Epsilon-Caprolactone) Diblock Copolymer for Efficient Intracellular Release of Doxorubicin. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 848-854.
127. Fehrenbacher, N.; Jaattela, M., Lysosomes as Targets for Cancer Therapy. *Cancer Res* **2005**, *65*, 2993-2995.
128. Levicar, N.; Strojnik, T.; Kos, J.; Dewey, R. A.; Pilkington, G. J.; Lah, T. T., Lysosomal Enzymes, Cathepsins in Brain Tumour Invasion. *J Neuro-Oncol* **2002**, *58*, 21-32.

129. Yamashita, S.; Yamashita, J.; Sakamoto, K.; Inada, K.; Nakashima, Y.; Murata, K.; Saishoji, T.; Nomura, K.; Ogawa, M., Increased Expression of Membrane-Associated Phospholipase-A2 Shows Malignant Potential of Human Breast-Cancer Cells. *Cancer* **1993**, *71*, 3058-3064.
130. Caldorera-Moore, M. E.; Liechty, W. B.; Peppas, N. A., Responsive Theranostic Systems: Integration of Diagnostic Imaging Agents and Responsive Controlled Release Drug Delivery Carriers. *Accounts Chem Res* **2011**, *44*, 1061-1070.
131. Wei, H.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X., Thermo-Sensitive Polymeric Micelles Based on Poly(N-Isopropylacrylamide) as Drug Carriers. *Prog Polym Sci* **2009**, *34*, 893-910.
132. Qing, G. Y.; Li, M. M.; Deng, L. J.; Lv, Z. Y.; Ding, P.; Sun, T. L., Smart Drug Release Systems Based on Stimuli-Responsive Polymers. *Mini-Rev Med Chem* **2013**, *13*, 1369-1380.
133. Li, P.; Zheng, Y. Y.; Ran, H. T.; Tan, J. X.; Lin, Y. J.; Zhang, Q. X.; Ren, J. L.; Wang, Z. G., Ultrasound Triggered Drug Release from 10-Hydroxycamptothecin-Loaded Phospholipid Microbubbles for Targeted Tumor Therapy in Mice. *Journal of Controlled Release* **2012**, *162*, 349-354.
134. Oliveira, H.; Perez-Andres, E.; Thevenot, J.; Sandre, O.; Berra, E.; Lecommandoux, S., Magnetic Field Triggered Drug Release from Polymersomes for Cancer Therapeutics. *Journal of Controlled Release* **2013**, *169*, 165-170.
135. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C., Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloid Surface B* **2010**, *75*, 1-18.
136. Kurupparachchi, M.; Savoie, H.; Lowry, A.; Alonso, C.; Boyle, R. W., Polyacrylamide Nanoparticles as a Delivery System in Photodynamic Therapy. *Mol Pharmaceut* **2011**, *8*, 920-931.
137. Wang, Z.; Yu, L. L.; Lv, C.; Wang, P.; Chen, Y. D.; Tang, X. J., Photoresponsive Cross-Linked Polymeric Particles for Phototriggered Burst Release. *Photochem Photobiol* **2013**, *89*, 552-559.
138. <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/fluorescence-microscopy-and-immunofluorescence-if/organelle-stains-for-fluorescence-imaging-selection-guide.html>.
139. Torchilin, V. P., Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting. *Annu Rev Biomed Eng* **2006**, *8*, 343-375.
140. Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B., Mitochondria as Targets for Cancer Chemotherapy. *Semin Cancer Biol* **2009**, *19*, 57-66.
141. Keil, V. C.; Funke, F.; Zeug, A.; Schild, D.; Muller, M., Ratiometric High-Resolution Imaging of Jc-1 Fluorescence Reveals the Subcellular Heterogeneity of Astrocytic Mitochondria. *Pflugers Arch* **2011**, *462*, 693-708.
142. Plattner, H., *Zellbiologie*. 2 ed.; Thieme: 2002.
143. Muratovska, A.; Lightowers, R. N.; Taylor, R. W.; Wilce, J. A.; Murphy, M. P., Targeting Large Molecules to Mitochondria. *Adv Drug Deliver Rev* **2001**, *49*, 189-198.

144. Murphy, M. P., Targeting Lipophilic Cations to Mitochondria. *Bba-Bioenergetics* **2008**, 1777, 1028-1031.
145. Datenblatt. Mitotracker® Mitochondrion-Selective Probes 2008
146. Liberman, E. A.; Topaly, V. P.; Tsofina, L. M.; Jasaitis, A. A.; Skulache.Vp, Mechanism of Coupling of Oxidative Phosphorylation and Membrane Potential of Mitochondria. *Nature* **1969**, 222, 1076-&.
147. Teicher, B. A.; Holden, S. A.; Cathcart, K. N. S., Efficacy of Pt(Rh-123)2 as a Radiosensitizer with Fractionated X-Rays. *Int J Radiat Oncol* **1987**, 13, 1217-1224.
148. Buckler, K. J.; Vaughan-Jones, R. D., Effects of Mitochondrial Uncouplers on Intracellular Calcium, Ph and Membrane Potential in Rat Carotid Body Type I Cells. *J Physiol* **1998**, 513 ( Pt 3), 819-33.
149. Blaikie, F. H.; Brown, S. E.; Samuelsson, L. M.; Brand, M. D.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P., Targeting Dinitrophenol to Mitochondria: Limitations to the Development of a Self-Limiting Mitochondrial Protonophore. *Bioscience Rep* **2006**, 26, 231-243.
150. Settembre, C.; Fraldi, A.; Medina, D. L.; Ballabio, A., Signals from the Lysosome: A Control Centre for Cellular Clearance and Energy Metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, 14, 283-96.
151. Appelqvist, H.; Waster, P.; Kagedal, K.; Ollinger, K., The Lysosome: From Waste Bag to Potential Therapeutic Target. *J Mol Cell Biol* **2013**, 5, 214-26.
152. Datenblatt. LysoTracker® and LysoSensor™ Probes 2007.
153. Fehrenbacher, N.; Jaattela, M., Lysosomes as Targets for Cancer Therapy. *Cancer Res* **2005**, 65, 2993-5.
154. Datenblatt. CellMask™ Plasma Membrane Stains 2007.
155. Minsky, M., Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* **1988**, 10, 128-138.
156. Henkel, K., Die Mikrofibel. 2003.
157. Zeiss, Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Broschüre: 45-0029 d/09.03.
158. Mulisch, M., *Romeis Mikroskopische Technik*. 18 ed.; Spektrum: 2010.
159. Givan, A. L., Flow Cytometry Protocols. Hawley, T. S., Ed. Springer: 2011.
160. Rahman, M., Introduction to Flow Cytometry. Serotec: 2006.
161. Rothe, A., Technische Und Methodische Grundlagen Der Durchflusszytometrie. In *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger: 2007.
162. Handbuch, Instructions for Use of Infinite M1000. Tecan: 2008.
163. Bolte, S.; Cordelieres, F. P., A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* **2006**, 224, 213-232.



164. Barlow, A. L.; MacLeod, A.; Noppen, S.; Sanderson, J.; Guerin, C. J., Colocalization Analysis in Fluorescence Micrographs: Verification of a More Accurate Calculation of Pearson's Correlation Coefficient. *Microsc Microanal* **2010**, *16*, 710-724.
165. Costes, S. V.; Daelemans, D.; Cho, E. H.; Dobbin, Z.; Pavlakis, G.; Lockett, S., Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys J* **2004**, *86*, 3993-4003.
166. Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H., A Practical Guide to Evaluating Colocalization in Biological Microscopy. *Am J Physiol-Cell Ph* **2011**, *300*, C723-C742.
167. Manders, E. M. M.; Verbeek, F. J.; Aten, J. A., Measurement of Colocalization of Objects in Dual-Color Confocal Images. *Journal of Microscopy-Oxford* **1993**, *169*, 375-382.
168. PerkinElmer, Volocity User Guide. 21.0 ed.; 2011.
169. Leica, *Leica Tcs Sp5 Betriebsanleitung*. 2008.
170. <http://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-57>.
171. Mittelman, D.; Wilson, J. H., The Fractured Genome of Hela Cells. *Genome Biol* **2013**, *14*, 111.
172. <http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-115>.
173. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M., A Human Cell Line from a Pleural Effusion Derived from a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1973**, *51*, 1409-16.
174. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284*, 143-7.
175. Kelsch, A.; Tomcin, S.; Rausch, K.; Barz, M.; Mailander, V.; Schmidt, M.; Landfester, K.; Zentel, R., Hpm Copolymers as Surfactants in the Preparation of Biocompatible Nanoparticles for Biomedical Application. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4179-4187.
176. York, A. W.; Zhang, Y.; Holley, A. C.; Guo, Y.; Huang, F.; McCormick, C. L., Facile Synthesis of Multivalent Folate-Block Copolymer Conjugates Via Aqueous Raft Polymerization: Targeted Delivery of Sirna and Subsequent Gene Suppression. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 936-43.
177. Rihova, B.; Bilej, M.; Vetvicka, V.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Kopecek, J.; Duncan, R., Biocompatibility of N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymers Containing Adriamycin. Immunogenicity, and Effect on Haematopoietic Stem Cells in Bone Marrow in Vivo and Mouse Splenocytes and Human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro. *Biomaterials* **1989**, *10*, 335-42.
178. Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A., Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033-2036.
179. Nuhn, L.; Hirsch, M.; Krieg, B.; Koynov, K.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Helm, M.; Zentel, R., Cationic Nanohydrogel Particles as Potential Sirna Carriers for Cellular Delivery. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2198-2214.

180. Hofmann, D.; Messerschmidt, C.; Bannwarth, M. B.; Landfester, K.; Mailander, V., Drug Delivery without Nanoparticle Uptake: Delivery by a Kiss-and-Run Mechanism on the Cell Membrane. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 1369-71.
181. Lorenz, S.; Tomcin, S.; Mailander, V., Staining of Mitochondria with Cy5-Labeled Oligonucleotides for Long-Term Microscopy Studies. *Microsc Microanal* **2011**, *17*, 440-445.
182. Scherer, D.; Robinson, J. R.; Kreuter, J., Influence of Enzymes on the Stability of Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles. *Int J Pharm* **1994**, *101*, 165-168.
183. Lenaerts, V.; Couvreur, P.; Christiaens-Leyh, D.; Joiris, E.; Roland, M.; Rollman, B.; Speiser, P., Degradation of Poly (Isobutyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Biomaterials* **1984**, *5*, 65-8.
184. Ryan, B.; McCann, G., Novel Sub-Ceiling Temperature Rapid Depolymerization-Repolymerization Reactions of Cyanoacrylate Polymers. *Macromol Rapid Comm* **1996**, *17*, 217-227.
185. Leonard, F.; Kulkarni, R. K.; Brandes, G.; Nelson, J.; Cameron, J. J., Synthesis and Degradation of Poly(Alkyl Alpha-Cyanoacrylates). *J Appl Polym Sci* **1966**, *10*, 259-8.
186. Barthel, A. Mikrostrukturelle Langzeituntersuchung Biokompatibler Polymernanopartikel in Unterschiedlichen Zelltypen. Diplomarbeit, 2010.
187. Panyam, J.; Labhasetwar, V., Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue. *Adv Drug Deliver Rev* **2003**, *55*, 329-347.
188. Panyam, J.; Labhasetwar, V., Dynamics of Endocytosis and Exocytosis of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharm Res-Dord* **2003**, *20*, 212-220.
189. Heller, A.; Brockhoff, G.; Goepferich, A., Targeting Drugs to Mitochondria. *Eur J Pharm Biopharm* **2012**, *82*, 1-18.
190. Rhee, W. J.; Bao, G., Slow Non-Specific Accumulation of 2'-Deoxy and 2'-O-Methyl Oligonucleotide Probes at Mitochondria in Live Cells. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*.
191. Wang, X. L.; Su, B.; Lee, H. G.; Li, X. Y.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. W., Impaired Balance of Mitochondrial Fission and Fusion in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **2009**, *29*, 9090-9103.
192. Ulbrich, K.; Subr, V., Structural and Chemical Aspects of Hpma Copolymers as Drug Carriers. *Adv Drug Deliver Rev* **2010**, *62*, 150-166.
193. Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Kabanov, A. V., The Uptake of N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamide Based Homo, Random and Block Copolymers by Human Multi-Drug Resistant Breast Adenocarcinoma Cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5682-5690.
194. Barz, M.; Tarantola, M.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Luxenhofer, R.; Janshoff, A.; Theato, P.; Zentel, R., From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional Hpma-Based Self-Assembled Nanoaggregates. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114-3118.
195. Hocherl, A.; Dass, M.; Landfester, K.; Mailander, V.; Musyanovych, A., Competitive Cellular Uptake of Nanoparticles Made from Polystyrene, Poly(Methyl Methacrylate), and Polylactide. *Macromol Biosci* **2012**, *12*, 454-64.

196. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Knauer, S. K.; Stauber, R. H., Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology. *Nature Nanotechnology* **2013**, *8*, 772-U1000.
197. Nienhaus, G. U.; Maffre, P.; Nienhaus, K., Studying the Protein Corona on Nanoparticles by Fcs. *Fluorescence Fluctuation Spectroscopy (Ffs), Pt B* **2013**, *519*, 115-137.
198. Beller, M.; Sztalryd, C.; Southall, N.; Bell, M.; Jackle, H.; Auld, D. S.; Oliver, B., Copi Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis. *Plos Biol* **2008**, *6*, e292.
199. Schaeffel, D.; Staff, R. H.; Butt, H. J.; Landfester, K.; Crespy, D.; Koynov, K., Fluorescence Correlation Spectroscopy Directly Monitors Coalescence During Nanoparticle Preparation. *Nano Letters* **2012**, *12*, 6012-6017.
200. Dixit, V.; Van den Bossche, J.; Sherman, D. M.; Thompson, D. H.; Andres, R. P., Synthesis and Grafting of Thioctic Acid-Peg-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells. *Bioconjugate Chem* **2006**, *17*, 603-609.

## **Danksagung**

## Publikationen

- Artikel**     S. Tomcin, A. Kelsch, V. Mailänder, R. Zentel, K. Landfester  
Nanoparticles stabilized by HPMA-based block copolymers promote initial burst release of a hydrophobic drug model (in Vorbereitung)
- L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailänder, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel  
Size-dependent knockdown potential of siRNA-loaded cationic nanohydrogel particles (eingereicht **2014**)
- S. Tomcin, G. Baier, K. Landfester, V. Mailänder  
Pharmacokinetic on a microscale: Visualizing Cy5-labeled Oligonucleotide Release from Poly(*n*-butylcyanoacrylate) (PBCA) Nanocapsules in Cells (eingereicht **2014**)
- M. Bannwarth, S. Ebert, M. Lauck, U. Ziener, S. Tomcin, G. Jakob, K. Münnemann, V. Mailänder, A. Musyanovych, K. Landfester  
Magnetic Tracing and Releasing from Nanocapsules for Combined Imaging and Therapy (eingereicht **2014**)
- G. Baier, A. Baki, S. Tomcin, V. Mailänder, E. Alexandrino, F. Wurm, K. Landfester  
Stabilization of nanoparticles synthesized by miniemulsion polymerization using „green“ amino-acid based surfactants. *Macromol. Symp.*, **2013**, 337, 9-17
- A. Kelsch, S. Tomcin, K. Rausch, M. Barz, V. Mailänder, K. Landfester, R. Zentel  
HPMA Copolymers as Surfactants in the Preparation of Biocompatible Nanoparticles for Biomedical Application. *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 4179-4187
- S. Lorenz, S. Tomcin, V. Mailänder  
Staining of Mitochondria with Cy5-Labeled Oligonucleotides for Long-Term Microscopy Studies. *Microsc. Microanal.*, **2011**, 17, 440-445
- Vorträge**     *PBCA nanocapsules – rapid release of oligonucleotides to target mitochondria*  
ZING Konferenz, Lanzarote 02/2013
- Poster**        S. Tomcin, G. Baier, K. Landfester, V. Mailänder  
*PBCA nanocapsules – rapid release of oligonucleotides to target mitochondria*  
ZING Konferenz, Lanzarote 02/2013 (erster **Posterpreis**)
- S. Tomcin, G. Baier, S. Lorenz, A. Musyanovych, K. Landfester, V. Mailänder  
*PBCA nanocapsules as a versatile drug delivery platform: Rapid cytoplasmatic delivery of payloads by endosomal escape*  
NanoBiomed-Konferenz, Frankfurt 03/2012 (erster **Posterpreis**)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Juni 2011 bis April 2014 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere am Max-Planck-Institut für Polymerforschung erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen (auch Internet) entnommen sind, habe ich als solche eindeutig kenntlich gemacht.

Mainz, 23. April 2014

\_\_\_\_\_

(Stephanie Tomcin)

## Lebenslauf