



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



Korrelative Mikroskopie von Partikel-Zell-Interaktionen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

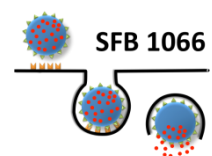
Im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Patricia Renz

geb. in Oelsnitz/Vogtl.



Mainz, August 2016



amtierender Dekan:

1. Gutachterin:
2. Gutachterin:

Tag der mündlichen Prüfung:

„Es kommt immer alles anders als man denkt“

von Moni

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Korrelative Mikroskopie	1
1.2 Zellen und Nanopartikel - Bedeutung für die Medizin.....	2
1.2.1 Eukaryotische Zellen	2
1.2.2 Dendritische Zellen.....	3
1.2.3 Polymere für die Biomedizin und in der Krebstherapie	4
1.2.4 Motivation und Ziel für diese Arbeit	7
2 Material & Methoden	8
2.1 Zellbiologisches Arbeiten	8
2.1.1 verwendete Zelllinien.....	8
2.1.1.1 HeLa-Zellen.....	8
2.1.1.2 Mesenchymale Stammzellen	8
2.1.1.3 Dendritische Zellen.....	8
2.1.1.4 Kultivierung der Zellen	9
2.1.2 Transfektion von Zellen mit Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent	10
2.1.2.1 Färbung mit HaloTag	10
2.1.2.2 Färbung mit SNAP-Tag.....	10
2.1.3 Bakterienkulturen	11
2.1.3.1 Verwendete Plasmide	11
2.1.3.2 Verwendete Bakterienstämme	12
2.1.3.3 Medien	12
2.1.3.4 Kultivierung und Lagerung der Bakterienstämme	13

2.2	Präparations- und molekularbiologische Methoden.....	13
2.2.1	„Drop Casting“ von Suspensionen.....	13
2.2.2	Immunmarkierungen von Ultradünnschnitten	13
2.2.3	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien.....	14
2.3	Analysemethoden.....	15
2.3.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	15
2.3.1.1	Chemische Fixierung.....	18
2.3.1.2	Kontrastierung mit Schwermetallen.....	19
2.3.1.3	Hochdruckgefrieren.....	19
2.3.1.4	Gefriersubstitution und Einbettung der Zellen	20
2.3.1.5	Ultradünnschnitte.....	20
2.3.1.6	Tomographie	21
2.3.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX).....	21
2.3.3	Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS).....	21
2.3.4	Rasterelektronenmikroskopie	22
2.3.5	Konfokale Laserrastermikroskopie	23
2.3.6	Durchflusszytometrie mittels FACS®	26
2.3.7	Zytotoxizitätstest	27
3	Ergebnisse & Diskussion	28
3.1	Korrelative Mikroskopie	29
3.1.1	Transfektion von Zellen	30
3.1.2	Immunmarkierung von Ultradünnschnitten	38
3.2	Direkter Nachweis von polymeren Nanokapseln	41
3.2.1	Charakterisierung von Polyharnstoffkapseln	41
3.2.1.1	Größe, Zetapotenzial, Feststoffgehalt.....	41
3.2.1.2	„Drop Casting“	44

3.2.1.3	Einbettung in Trehalose	45
3.2.1.4	EDX und EELS.....	46
3.2.1.5	Cryo-TEM.....	48
3.2.1.6	Tomographie	49
3.2.2	Biologie: Wechselwirkung mit Zellen	50
3.2.2.1	Korrelative Methode: CLSM und TEM.....	50
3.2.2.2	Durchflusszytometrie und Zytotoxizität mittels FACS®	58
3.3	Methoden zum Nachweis funktionalisierter Nanoträger-Systeme	60
3.3.1	Antikörperfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel (DEMA-Partikel)	60
3.3.2	Nachweis von Nanohydrogelen	72
3.3.3	Funktionalisierte HES-Kapseln mit Mannose/Trimannose	75
	Zusammenfassung.....	79
	Summary	82
	Anhang	84
A	Abkürzungsverzeichnis.....	84
B	Experimenteller Teil und Materialien	86
B.1	Nanokapseln und –partikel	86
B.1.1	Polyharnstoffkapseln.....	86
B.1.2	Magnetische Polystyrolpartikel (DEMA-Partikel).....	87
B.1.3	Nanohydrogele	87
B.1.4	HES-Kapseln.....	88
B.2	Vorbereitung von Saphir-Discs	88
B.3	Poly-L-Lysin Beschichtung von Deckgläsern, Objektträgern und Saphirdiscs	89
B.4	Schnitte ablösen mit Polyacrylsäure	89
B.5	Verwendete Chemikalien	90
B.5.1	Medien und Seren	91

B.5.2	Antikörper.....	91
B.5.3	Fixan für Chemische Fixierung.....	91
B.5.4	Herstellung von Osmiumtetroxidlösungen.....	92
B.5.5	Herstellung von Uranylacetatlösungen	92
B.5.6	Herstellung von Trehalose-Lösungen	92
B.5.7	Ionische Flüssigkeiten	93
B.5.8	Substitutionsmedium für die Gefriersubstitution	93
B.5.9	Herstellung von Einbettungsmedien (EPON).....	93
B.5.10	Herstellung von Blockadepuffer PBG	93
B.6	Verwendete Materialien	94
B.7	Verwendete Geräte	94
B.8	Verwendete Software.....	95
	Literaturverzeichnis	96
	Abbildungsverzeichnis	103
	Tabellenverzeichnis	105
	Publikationen.....	106
	Lebenslauf	107
	Danksagung	108
	Eidesstaatliche Erklärung.....	109

1 Einleitung

1.1 Korrelative Mikroskopie

Die korrelative Mikroskopie (engl. „correlative light and electron microscopy“) vereint die Vielseitigkeit der Fluoreszenzmikroskopie mit der hohen räumlichen Auflösung der Transmissions-elektronenmikroskopie. Die sogenannte „Region of Interest“ (ROI) wird am Fluoreszenzmikroskop selektiert und die Analyse der Ultrastruktur erfolgt am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit hoher Auflösung. Die Fluoreszenz ist somit direkt mit den subzellulären Strukturen korreliert [1].

Die Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie ist eines der stärksten Techniken der Zellbiologie und die Vielzahl an Fluoreszenz-Markern erlaubt die Visualisierung von Zellkomponenten, Proteinverteilungen, Signalwegen oder biochemischen Reaktionen in lebenden Zellen. Allerdings ist die Auflösung der Fluoreszenzmikroskope durch die Beugung limitiert, und lediglich markierte Strukturen können abgebildet werden. Nicht markierte Strukturen und Details markierter Strukturen bleiben somit sehr oft verdeckt oder unerkant. Hochauflösende Mikroskope konnten die Beugungsgrenze bisher auf 20 – 60 nm verringern [2]. Mithilfe des TEMs werden subzelluläre Details von sowohl markierten als auch unmarkierten Strukturen offenbart, jedoch können hierbei nur fixierte und geschnittene Proben untersucht werden und es gibt lediglich eine limitierte Anzahl an Markern.

Die korrelative Mikroskopie kombiniert die Vorzüge beider Mikroskope, um die gesamte subzelluläre Struktur visualisieren zu können. *In vivo* wurde die Korrelation bereits in zahlreichen Zellkultur-Systemen durchgeführt [3, 4]. Das Konzept ist, neben der Anwendung für Zellkulturen, begrenzt auf Embryos und sehr kleine Proben [5]. Größere Proben, wie Gewebe, müssen vorher fixiert, eingebettet und geschnitten werden. Die korrelative Analyse erfolgt dann für gewöhnlich mit Harz- oder Cryo-Schnitten. Vorteilhaft dabei ist, dass viele ROI analysiert werden können und die Schnitte die Fluoreszenz von einer sehr dünnen optischen Ebene (50 – 200 nm) emittieren, wodurch sie optimal für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet sind. Zudem ist die Methode einfach und weit verbreitet, und es können viele verschiedene Antigene auf Schnitten von einer einzigen Probe analysiert werden. Eine weitere mögliche Anwendung der korrelativen Mikroskopie ist, verschiedene Schnitte, die vom selben Block geschnitten worden sind, differenziert zu markieren. Die Schnitte werden somit unabhängig voneinander für beide Mikroskope montiert und präpariert [6, 7]. Dies

wird genutzt, um abundante und regelmäßig geformte Strukturen zu markieren, sodass die Korrelation von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie-Daten einzelner Strukturen nicht notwendig ist, wie beispielsweise bei einigen Zellorganellen oder „Junctions“ zwischen Epithelzellen. Jegliche immunoelektronenmikroskopischen Experimente profitieren jedoch von korrelativen Anwendungen, da markierte Bereiche durch die Fluoreszenz identifiziert und damit die Qualität der Markierungen vor der Analyse im TEM überprüft werden können. Dabei können die Fluoreszenzsignale im TEM mit markierten und nicht markierten Strukturen korreliert werden. Alternativ kann die Methode auf ein- und demselben Schnitt angewendet werden [8-11]. Eingesetzt wird dieses Verfahren hauptsächlich, wenn die zu untersuchenden Strukturen sehr klein sind (Vesikel, Granulate, kleine Organellen) oder wenn diese nicht auf zwei verschiedenen Schnitten zu finden sind. Außerdem ist die Methode hilfreich bei seltenen Zellpopulationen, wie beispielsweise Stammzellen. Die Vielzahl an korrelativen Ansätzen bietet damit ein weites Spektrum an Detektionsmöglichkeiten für verschiedene Anwendungsbereiche.

1.2 Zellen und Nanopartikel - Bedeutung für die Medizin

1.2.1 Eukaryotische Zellen

Eukaryotische Zellen weisen Größen von ca. 10 – 30 μm auf und besitzen einen Zellkern [12] (siehe Abbildung 1). Die Plasmamembran umgibt die gesamte Zelle und umschließt das Zytoplasma, wo sich die vielfältigen Organellen befinden. Als Gerüst der Zelle bilden Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente das sogenannte Zytoskelett, welches der Zelle ihre Form und Stabilität gibt und über Proteine bzw. Proteinkomplexe mit der Plasmamembran verknüpft ist [13].

Leicht unter dem Lichtmikroskop erkennbar ist der Zellkern, auch Nukleus genannt, mit einer Größe von ca. 5 – 15 μm . Der Kern ist von einer inneren und einer äußeren Membran umgeben und enthält die Erbinformationen als DNA. Werden Informationen durch Transkription in mRNA umgeschrieben, verlässt diese Proteinsequenz den Zellkern durch die Kernporen und wird von Ribosomen durch Translation in das entsprechende Protein übersetzt. Die Ribosomen befinden sich dabei am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER), das an die äußere Kernmembran gebunden ist. Das ER ist ein intrazellulärer Membranstapel mit einer großen gefalteten Oberfläche. Am glatten ER, an dem keine Ribosomen anhaften, findet die Hormonsynthese statt und es fungiert als Kohlenhydrat- und

Calciumspeicher. Ein weiteres Membranstapelsystem stellt der Golgi-Apparat dar, welcher die im rauen ER gebildeten Proteine weiter modifiziert und in Vesikel verpackt. Der Golgi-Apparat wird in drei Bereiche unterteilt: einer dem ER zugewandten Seite, einem inneren Teil und einer dem ER abgewandten Seite, wo die Vesikel mit verpackten Proteinen abgeschnürt und zum Zielort geleitet werden. Die Kraftwerke der Zellen sind die Mitochondrien. Sie besitzen eine auffällige Morphologie und sind am Zellstoffwechsel beteiligt, denn hier finden der Adenosintriphosphat (ATP)-Stoffwechsel und die Atmungskette statt. Zelluläre Veränderungen, wie eine beginnende Apoptose, können über die Morphologie der Mitochondrien beobachtet werden [14].

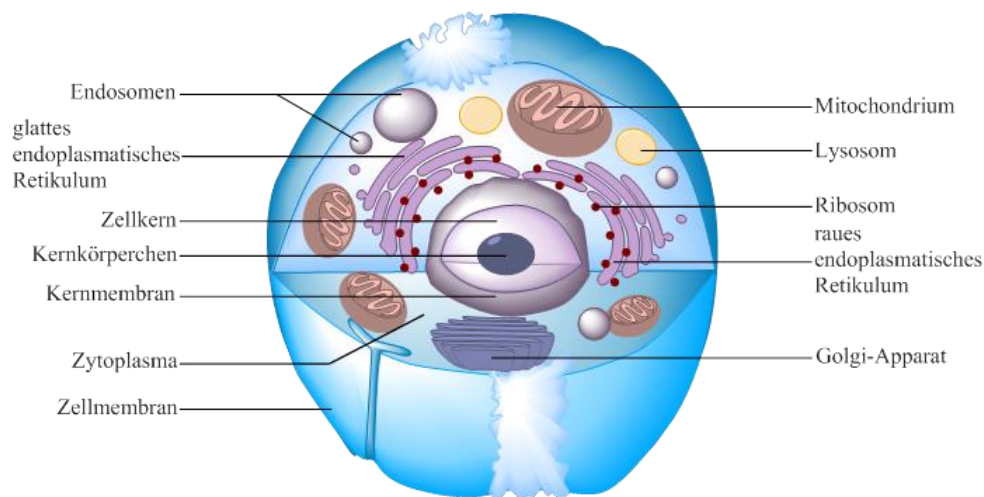


Abbildung 1: Aufbau einer eukaryotischen Zelle; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra.

1.2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (lat. „dendriticus“, verzweigt, DCs) gehören zusammen mit Monozyten, Makrophagen und B-Zellen zu den „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. RALPH STEINMAN entdeckte die dendritischen Zellen in der Milz und beschrieb sie erstmals Mitte der 1970er-Jahre. Ihren Namen bekamen sie aufgrund ihrer sternförmigen Gestalt mit fingerförmigen, zytoplasmatischen Ausläufern innerhalb von Geweben. Sie stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark (progenitor DCs) ab und gelangen mit dem Blutstrom (precursor DCs) ins Gewebe, wo sie als unreife Zellen (immature DCs) verweilen und feine Verästelungen ausbilden. In der Haut werden sie Langerhans-Zellen genannt und bilden mit ihren Fortsätzen ein dichtes Netzwerk in der Epidermis. Die Ausläufer der unreifen DCs sind stetig in Bewegung, um

Antigene aufzuspüren. Durch Makropinozytose sind DCs in der Lage große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit aus der Umgebung aufzunehmen. Dadurch können kleine Moleküle, wie Toxine oder Viren ins Innere der Zellen gelangen, wodurch die DCs aktiviert werden. Gefangene Pathogene werden in ihrem Inneren degradiert und prozessiert. Die unreifen DCs reifen heran und wandern mit dem Lymphstrom in die Lymphknoten, wo sie die aufgenommenen Antigene als Peptide an MHC-Moleküle binden und an ihrer Zelloberfläche den T-Zellen im peripheren lymphatischen Gewebe präsentieren. DCs bilden eine heterogene Gruppe und gehören zu den wichtigsten Zellen des Immunsystems. Eine weitere wichtige Funktion der DCs ist die Überbringung der genauen Informationen von Ort, Art und Stärke einer Entzündung an die T-Lymphozyten. Zudem entscheiden sie über den Aufbau der Immunantwort. DCs produzieren außerdem hochaktiv Cytokine, die zur Aktivierung weiterer Immunzellen führen [15, 16].

1.2.3 Polymere für die Biomedizin und in der Krebstherapie

Polymere sind chemische Verbindungen, die sich aus langkettigen und/oder verzweigten Molekülen (Makromolekülen) zusammensetzen [17]. Natürlich vorkommende Polymere (Biopolymere) sind beispielsweise Polysaccharide wie Zellulose, Stärke und Chitin oder Proteine wie Seide oder Haare. Synthetisch hergestellte Polymere sind kommerziell interessant und können günstig in großen Mengen produziert werden. Aus diesem Grund sind Polymere unter anderem verstärkt in den Fokus biomedizinischer Anwendungen vorgedrungen [18, 19].

Beispielsweise kommen für Implantate oder Gefäßprothesen (engl. „stents“) biokompatible Polymere zum Einsatz. Dabei stellen bioabbaubare Polymere gut geeignete Wirkstofftransportsysteme (engl. „drug delivery“) dar [20-22], aber auch für die Herstellung künstlicher Gewebe sind Polymere interessant [23]. So werden Knochenbrüche bereits mit Polyestern verschraubt und mit der Zeit wird die Schraube entweder abgebaut oder verwächst mit dem Knochengewebe, wodurch eine operative Entfernung nicht mehr notwendig ist.

Polymere sind kostengünstig und eine gezielte Steuerung ihrer Eigenschaften ist möglich, denn jede Anwendung bringt andere Bedingungen mit sich, die erfüllt werden müssen. Die Variationsmöglichkeiten von Polymertypen sind dabei vielfältig. Bei Implantaten können Polymere z. B. selbst als Material verwendet oder als Beschichtung eingesetzt werden, was Abstoßreaktionen des menschlichen Körpers verringert. Haben Polymere keinen Einfluss auf umliegendes Gewebe,

gelten sie als biokompatibel und werden in bioinerte und bioabbaubare Polymere unterschieden. Bioinerte Polymere weisen keinerlei Wechselwirkungen mit dem Organismus auf und werden von der biologischen Umgebung nicht beeinflusst. Dennoch verbleiben die polymeren Materialien nicht zwingend permanent im Körper, sondern sie altern entsprechend ihrer Zusammensetzung unabhängig vom umliegenden biologischen Gewebe. Ein häufig eingesetztes bioinertes Polymer ist beispielsweise Polystyrol. Als bioabbaubar werden Polymere bezeichnet, die über die Zeit abgebaut werden, wobei der Zeitraum nicht maßgeblich ist. Einige Abbauprozesse sind bereits gut untersucht, wie die Hydrolyse bioabbaubarer Polyester [24-26]. Dabei wird das Polymer an seiner Carbonylfunktion unter Wassereinlagerung abgespalten und der Abbau kann enzymatisch katalysiert ablaufen [27].

Andere Anforderungen werden wichtig, wenn Polymere als Transportmittel für Wirkstoffe verwendet werden [28]. Die Polymere sollten dann nicht mit dem Wirkstoff reagieren und keine eigene pharmakologische Wirkung aufweisen. Soll eine Wirkstofffreisetzung bewirkt werden, muss das Polymer porös oder bioabbaubar sein, sodass der Wirkstoff freigesetzt werden kann. Dabei gibt es die Möglichkeiten, dass die Oberfläche des Partikels abgebaut wird oder sich der Partikel insgesamt langsam auflöst [28]. Ist der Abbau des Polymers an ein bestimmtes Enzym gekoppelt, kann eine hohe Spezifität an einen bestimmten Freisetzungsort erreicht werden. Die höchste Spezifität an einen bestimmten Wirkort oder Zelltyp wird durch die Anbindung spezifischer Antikörper an die Polymerpartikel erreicht. Der gewählte Antikörper sollte dabei möglichst gut an die Epitope eines Antigens der Zielzelle binden.

Ein entscheidender, wenn auch weniger spezifischer, Faktor für die zelluläre Aufnahme von Polymeren Partikeln ist die Modifikation der Oberflächen mit funktionellen Gruppen sowie die Erzeugung von geladenen Oberflächen. Der Aufnahmemechanismus kann dadurch verlangsamt oder beschleunigt werden. Außerdem spielt die Größe der Partikel eine entscheidende Rolle, sodass Größen von weniger als 100 nm bevorzugt aufgenommen werden [29] und sich die Aufnahmemechanismen je nach Partikelgröße unterscheiden [30].

Aufgrund der genannten Anforderungen an polymere Partikel müssen die Parameter bereits bei der Synthese beachtet werden. Um Nanopartikel im Größenbereich von 50–500 nm mit geringer Größenschwankungen herzustellen, hat sich das Verfahren der Miniemulsionspolymerisation bewährt [31].

Nanopartikuläre Systeme mit polymeren Wirkstoffträgern sind außerdem für die Krebstherapie sehr interessant. Die Wirkstoffe können durch die Trägersysteme vor Abbaureaktionen abgeschirmt werden, was bei konventionellen Anwendungen von Wirkstoffen oft nicht möglich ist. Zudem können Wirkstoffe mit geringen Wasserlöslichkeiten effektiv transportiert werden. Um bestimmte Zielzellen oder -gewebe anzusteuern und die Freisetzung der Wirkstoffe lediglich am Zielort zu gewährleisten, kann die Trägersystemoberfläche durch eine Reihe an Modifikationen angepasst werden. Dies reduziert Nebeneffekte auf umliegendes gesundes Gewebe und erhöht gleichzeitig die Wirksamkeit der transportierten Wirkstoffe. Selbst die Blut-Hirn-Schranke kann mit nanopartikulären Systemen überwunden und die Verweildauer der Wirkstoffe im Blut erhöht werden, was weitere Vorteile von Nanopartikeln darstellt [32].

Bei der Tumorbehandlung kann der EPR-Effekt (engl. „enhanced permeability and retention“) genutzt werden [33]. Dabei werden Nanopartikel und Makromoleküle passiv im Tumorgewebe angereichert, was durch den hohen Energiebedarf des Tumorgewebes zustande kommt. Der Tumor benötigt durch sein schnelles Wachstum viele Nährstoffe und Energie, weshalb sich in kürzester Zeit zahlreiche Blutgefäße im Tumorgewebe ausbilden. Während dieses Prozesses der Angiogenese kommt es durch das schnelle Wachstum mitunter auch zu dünnwandigen und fehlerhaften Blutgefäßen [34]. Durch ihre längere Verweildauer im Blut können sich Nanopartikel im Tumor anreichern. Besonders Polymere mit einem Molekulargewicht von 30 – 70 kDa reichern sich vorzugsweise im Tumorgewebe an [35]. Befinden sich die polymeren Nanopartikel im Tumorgewebe, ist sowohl ihre Aufnahme in die Tumorzelle als auch die Freisetzung von Wirkstoffen in den Nukleus oder ins Zytoplasma von Bedeutung [36].

Im Zytoplasma können ionische Oberflächen der Partikel genutzt werden, die zum osmotischen Anschwellen von Endosomen führen. Zudem kann ein gezielter Abbau der Wirkstoffträger durch einen niedrigen pH-Wert in Endosomen bewirkt werden. Basierend darauf können neue Ansätze in der Tumordiagnostik sowie der Chemotherapie entwickelt werden [37]. Unerlässlich bei der Anwendung in medizinischen Bereichen sind umfassende Untersuchungen und Risikobewertungen sowie klinische Studien, um die Toxizität neuer Wirkstoffe zu bewerten.

1.2.4 Motivation und Ziel für diese Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue Methode der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie zum Nachweis nanodimensionaler Kapseln und Partikel in der biologischen Umgebung von Immunzellen zu entwickeln. Denn polymere Nanokapseln sind in zellulärer Umgebung im Elektronenmikroskop so gut wie nicht sichtbar. Die Untersuchung fluoreszenzmarkierter nanopartikulärer Systeme mittels Lichtmikroskopie bietet großes Potenzial, Strukturen und Aufnahmemechanismen zu untersuchen. Polymere Wirkstoffträger können mit fluoreszierenden Markern beladen und innerhalb von Zellen detektiert werden. Allerdings ist es dabei nicht möglich, eine detaillierte bildliche Darstellung der ultrastrukturellen Morphologien der Trägersysteme bzw. der beteiligten Zellstrukturen zu erhalten. Es können zudem lediglich fluoreszenzmarkierte Strukturen erkannt werden, die Detektion unmarkierter Zellstrukturen oder Nanokapseln ist dabei nicht möglich. Hingegen kann die Elektronenmikroskopie sehr gut zur Untersuchung der Ultrastrukturen angewendet werden und liefert zudem Details der zellulären Strukturen, ohne dass eine zusätzliche Markierung notwendig ist. Bestimmend für den jeweiligen Verbleib und das intrazelluläre Trafficking von Nanokapseln und Nanopartikeln in Zellen sind die Aufnahmeprozesse durch Phagozytose bzw. Endozytose. Um diese Wege unterscheiden zu können, bietet sich beispielsweise eine spezifische Markierung der beteiligten Proteine mittels Transfektion von Zellen an. Die Wirkstoffträger sollen Zellen des Immunsystems erreichen und spezifisch ihre verkapselten Wirkstoffe innerhalb der Zellen am gewünschten Zielort freisetzen, um Tumore gezielt bekämpfen zu können. Dafür sollten dendritische Zellen als Modellzellen eingesetzt werden, nachdem die Etablierung eines korrelativen Systems zunächst an mesenchymalen Stammzellen durchzuführen war.

Die eingesetzten Trägersysteme enthielten zu Beginn der Studien keine Wirkstoffe, sondern Marker, um sie im Fluoreszenz- und Elektronenmikroskop nachweisen zu können. Neben dem bildlichen Nachweis der Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop und der Details im Elektronenmikroskop sollten elementspezifische Nachweismethoden zum Einsatz kommen, um die nanopartikulären Kapseln und Partikel eindeutig identifizieren zu können. Die Technik der korrelativen Methode sollte leicht anwendbar und ohne aufwändige Präparationen oder Informationsverlusten beim Transfer ins TEM durchführbar sein.

Außerdem galt es Wege zu finden, Nanokapseln im TEM abbilden bzw. nachweisen zu können, deren Kontrast zu schwach ist, um sie in zellulärer Umgebung detektieren zu können.

2 Material & Methoden

2.1 Zellbiologisches Arbeiten

2.1.1 verwendete Zelllinien

2.1.1.1 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden 1951 aus einem Cervixtumor (Gebärmutterhalskrebs) einer Gewebeprobe von der Afroamerikanerin HENRIETTA LACKS etabliert. Die Patientin starb noch im selben Jahr an den Folgen des Tumors. Diese epitheloiden Zellen wachsen in Monolagen und weisen eine sehr hohe Wachstums- bzw. Teilungsrate auf, wodurch sie kontinuierlich kultiviert werden können (DSMZ: HELA). Für biomedizinische Forschungsarbeiten ist diese Zelllinie aufgrund ihrer einfachen Handhabung und deren Unsterblichkeit sehr gut geeignet [38].

2.1.1.2 Mesenchymale Stammzellen

Diese multipotente Zelllinie wächst ebenfalls in Monolagen und wird aus einer Primärkultur gewonnen, die sich zu Knochenzellen (Osteoblasten), Knorpelzellen (Chondrozyten) und Fettzellen (Adipozyten) differenzieren kann [39]. Die hier verwendeten Zellen wurden aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders isoliert und die Genehmigung über die Gewinnung und Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen (MSCs) wurde durch das zuständige Ethikkomitee im Entnahmezentrum der Universität Ulm erteilt.

2.1.1.3 Dendritische Zellen

Aus Monozyten von gesunden Spendern wurden dendritische Zellen generiert. Die hierfür benötigten Buffy-coats (die Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und Blutplasma) wurden gemäß der zuständigen lokalen Ethikkommission sowie der Deklaration von Helsinki genehmigt und entnommen. Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) erfolgte standardmäßig mit *Ficoll*[®]. Pro Well einer 6-Well Platte wurden $1,5 \times 10^7$ PBMCs in 3 mL DC-

Medium (B.5) mit 2% Humanserum, 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (P/S) ausgesät. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Wells mit PBS gewaschen, um die nicht-adhärennten Zellen zu verwerfen. Um die DCs zu generieren, wurden die Monozyten für 48 h in jeweils 3 mL DC-Medium mit 800 IU/mL Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GMCSF) und 500 IU/mL Interleukin (IL4) inkubiert. Danach wurden 800 µL des Überstands zentrifugiert, verworfen, 1 mL DC-Medium mit 1,600 IU/mL GMCSF und 500 IU/mL IL4 zugegeben und die Zellen für 72 h im Brutschrank inkubiert. Der Vorgang wurde wiederholt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Die generierten DCs wurden anschließend mit PBS und 0,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von den Well-Platten gelöst, mit DMSO gemischt und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung eingefroren.

2.1.1.4 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der HeLa-Zellen und MSCs erfolgte nach dem Auftauen mit dem entsprechenden Medium (siehe B.5) in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Zusätzlich wurde den Medien ein Antibiotikum und für das Wachstum jeweils 1% P/S und 10% FBS (siehe B.5) zugesetzt. Für die Versuche wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in FBS-haltiges Medium überführt und die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählers (siehe B.7) bestimmt. Für die Bestimmung wurde der lebend-tot-Farbstoff Trypanblau verwendet und je nach Versuch 10.000 – 60.000 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 24-Well Platten oder *Ibidis* für ca. 24 – 48 h im Brutschrank kultiviert und anschließend die entsprechende Menge an Nanopartikeln zugegeben. Für das Hochdruckgefrieren wurden die Zellen auf speziellen Saphir-Disks kultiviert (siehe B.2).

Dendritische Zellen wurden für jeden Versuch bei 37 °C frisch aufgetaut und bei 470 *g* zentrifugiert, um das DMSO vom Medium zu entfernen. Nach dem Aussäen mit dem entsprechenden Medium (siehe B.5) in Well-Platten, auf Saphirs oder in *Ibidis* wurden die Zellen ebenfalls im Brutschrank bei den oben genannten Bedingungen für 24 – 48 h inkubiert, bevor Partikel zugesetzt wurden. So wird gewährleistet, dass sich die Zellen von dem Einfrierprozess erholen können.

2.1.2 Transfektion von Zellen mit Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent

Durch eine Transfektion wird Fremd-DNA oder -RNA in tierische und teilweise auch andere eukaryotische Zellen eingebracht. Die in dieser Arbeit angewendete Transfektion mit Liposomen wird dabei als Lipofektion bezeichnet. Es wurden für jeden Versuch ca. 2×10^4 MSCs pro Well einer 24-Well-Platte oder 5×10^3 MSCs pro Well eines 8er *Ibidis* ausgesät und die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um eine Konfluenz von 70 – 90% zu erreichen. Am nächsten Tag wurde 0,75 µL *Lipofectamine® 3000* in 25 µL *Opti-MEM®* Medium verdünnt. Für einen DNA Mastermix wurden 5 µg/mL der einzusetzenden DNA in 50 µL *Opti-MEM®* Medium verdünnt und 2 µL/µg *DNA P3000® Reagent* zugefügt. Der Mastermix wurde anschließend mit der *Lipofectamin® 3000* Reagenz 1:1 vermischt und nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Nach 2 – 4 Tagen Inkubationszeit im Brutschrank wurde je nach eingesetztem Plasmid der entsprechende Ligand (siehe 2.1.2.1 und 2.1.2.2) eingesetzt und die Proben analysiert.

2.1.2.1 Färbung mit HaloTag

Die transfizierten Zellen wurden mit einer Einsatzkonzentration von 5 µM des *HaloTag® TMR* oder *HaloTag® Alex Fluor® 488 (Promega)* für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Proben mit PBS oder *Opti-MEM®* Medium gespült und mit frischem Wachstumsmedium weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Analyse der lebenden Zellen am konfokalen Laserrastermikroskop (engl. „confocal laser scanning microscope“, CLSM) erfolgte nach erneutem Wechsel des Mediums.

2.1.2.2 Färbung mit SNAP-Tag

Die Färbung der transfizierten Zellen mit dem Liganden *SNAP-Cell® TMR-Star* oder *SNAP-Cell® Oregon Green® (New England Biolabs, NEB)* erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die SNAP-Tag Substrate wurden jeweils in 10 µL DMSO gelöst, um eine Stocklösung (0,6 mM *TMR-Star*; 1 mM *Oregon Green®*) zu erhalten. Für die transfizierten Zellen wurde das Substrat 1:200 mit Wachstumsmedium verdünnt, um eine Konzentration von 3 µM (*TMR-Star*) bzw. 5 µM (*Oregon Green®*) zu erhalten. Nach Zugabe des SNAP-Tag Liganden wurden die Zellen für 30 min im

Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffs wurden die Zellen drei Mal mit Wachstumsmedium gewaschen und weitere 30 min mit frischem Medium im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem Wechsel des Mediums erfolgte die Analyse der lebenden Zellen am CLSM.

2.1.3 Bakterienkulturen

2.1.3.1 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Plasmide der Firma Addgene sind in Tabelle 1 aufgelistet und wurden aus Bakterienstämmen gewonnen (siehe 2.2.3). Das in Tabelle 1 aufgelistete Kontroll-Plasmid *pSNAPf* (Plasmidkarte siehe Abbildung 2) der Firma New England Biolabs (NEB) konnte direkt eingesetzt werden.

Tabelle 1: verwendete Plasmide aus Bakterienstämmen.

Bezeichnung	Referenz	ID	Quelle
HaloTag-A2A-adenosine receptor	Berlot Lab HaloTag Fusions	plasmid #66995	Addgene; USA
HaloTag-beta2-adrenergic receptor	Berlot Lab HaloTag Fusions	plasmid #66994	Addgene; USA
ALK1-C-18	Davidson plasmids	plasmid #58188	Addgene; USA
Tubulin-C-18	Davidson plasmids	plasmid #58197	Addgene; USA
Clathrin-15	Davidson plasmids	plasmid #58190	Addgene; USA
pSNAPf -ADRβ2 Control Plasmid	NEB	N9184 S	NEB; USA

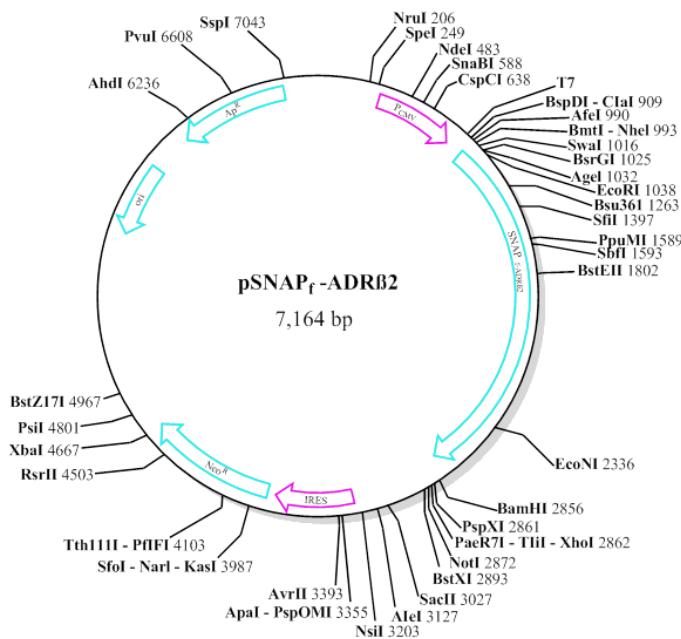
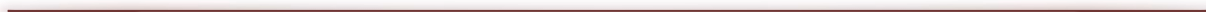


Abbildung 2: Plasmidkarte des Kontroll-Plasmids pSNAP_f-ADRB₂; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra; modifiziert nach NEB [40].

2.1.3.2 Verwendete Bakterienstämme

Es wurden Bakterienstämme von *Escherichia coli* verwendet, die die entsprechenden DNA-Sequenzen in Vektoren enthielten. Die Stämme wurden als Kolonien in Röhrcchen vom Hersteller geliefert und bis zur Kultivierung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.3.3 Medien

Um Agarplatten herzustellen wurde *Fast-Media® Kann Agar* bzw. *Fast-Media® Amp Agar* (InvivoGen) verwendet. Je eine Packung wurde mit 200 mL Mili-Q Wasser vermischt, in der Mikrowelle aufgeköcht und geschwenkt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Noch im heißen Zustand wurden die Medien in kleine Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen konnten die fertigen Platten direkt verwendet oder im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Zur Herstellung von LB Medien für kanamycin bzw. ampicillin resistente *E. coli* Stämme wurde jeweils eine Packung *Fast-Media® Kann LB* bzw. *Fast-Media® Amp LB* (InvivoGen) in 200 mL Mili-Q Wasser gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht und geschwenkt, bis das Medium klar war. Nach dem

Abkühlen konnten die Medien für die Kultivierung verwendet oder bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

2.1.3.4 Kultivierung und Lagerung der Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden durch einen 3-Ösen-Ausstrich auf die gegossenen Agarplatten (siehe 2.1.3.3) ausplattiert und anschließend entweder im Brutschrank bei 37 °C über Nacht kultiviert oder maximal 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Zur weiteren Kultivierung wurde jeweils eine Kolonie eines jeden Bakterienstammes von der Agarplatte abgenommen und in einen Erlenmeyerkolben mit 100 mL des entsprechenden LB Mediums überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und geschüttelt, bis eine deutliche Trübung zu sehen war. Anschließend daran erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung (siehe 2.2.3).

2.2 Präparations- und molekularbiologische Methoden

2.2.1 „Drop Casting“ von Suspensionen

Das Auftrocknen von Suspensionen (z. B. Partikelsuspensionen) auf beschichteten Kupfer-Trägernetzchen stellt eine einfache und schnelle Präparationsmethode dar [41]. Um zu verhindern, dass die nanopartikulären Teilchen zu dicht liegen bzw. die Probe durch Salze in der Lösung zu dick wird, werden die Suspensionen verdünnt bzw. direkt nach dem Aufbringen auf das Netzchen mit Filterpapier abgezogen.

2.2.2 Immunmarkierungen von Ultradünnschnitten

Ultradünnschnitte wurden für die Immunmarkierung auf *Poly-L-Lysin* beschichtete Deckgläschen überführt. Auf einem Strecktisch wurden die Schnitte bei 60 °C getrocknet und anschließend mit einem Fettstift umrahmt, sodass Puffer und Antikörper während der Markierung nicht weggeschwemmt werden konnten. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Zellen mit

Blockadepuffer maskiert. Dafür wurden pro Schnitt 40 µL PBG (Zusammensetzung siehe B.5.10) zugegeben und für ca. 20 min inkubiert. Anschließend wurden 25 µL des primären Antikörpers zugegeben und für ca. 1 h inkubiert. Die Antikörper (siehe B.5.2) wurden mit PBG auf eine Konzentration von 5 µg / mL verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgesaugt und es folgten 6 Waschschrte mit jeweils 40 µL PBG pro Schnitt für je 3 min. Die Schnitte durften während der Prozedur nicht trockenfallen. Dann wurden 25 µL des sekundären Antikörpers (siehe B.5.2) pro Schnitt zugegeben und ebenfalls ca. 1 h inkubiert. Da es sich meist um fluoreszierende Marker handelte, wurden die Proben vor Licht geschützt. Es folgten drei Waschschrte mit PBG für je 3 min und drei Waschschrte mit PBS für je 3 min. Schließlich wurden die Proben dreimal zügig mit Milli-Q gewaschen, getrocknet und mit *Fluoroshield™* oder *Mowiolösung* eingedeckelt. Die anschließende Untersuchung der Proben wurde am CLSM durchgeführt. Da *Fluoroshield™* DAPI enthält, konnten die Zellen anhand der fluoreszierenden Zellkerne detektiert werden.

2.2.3 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Um amplifizierte Plasmide aus Bakterienstämmen zu gewinnen, werden bei der Isolierung die Bakterien mittels alkalischer Lyse nach BIRNBOIM UND DOLY [42] zerstört. Dabei wird aus einer Einzelkolonie, die das korrekte Plasmid enthält, mittels Maxi-Plasmidpräparation eine große Menge an Plasmid gewonnen. Bei „high copy“-Plasmiden können aus den angeimpften Kultivierungsmedien nach der Inkubation bis zu 800 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Durchgeführt wurde die Plasmidisolierung in dieser Arbeit nach dem Herstellerprotokoll für „high copy“- Plasmide mit dem *QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (25)* der Firma Qiagen.

Die Bakterienstämme wurden nach der Kultivierung in Erlenmeyerkolben bei 6000 *g* für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und die Pellets jeweils mit 8 mL *Puffer P1* resuspendiert. Anschließend wurde *Puffer P2* zugegeben und invertiert. Als Kontrolle färbte sich das Lysat durch die Zugabe von *LyseBlue* zum Puffer blau und wurde viskos. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 8 mL des *Puffers S3* zugegeben und solange invertiert, bis sich das Lysat vollständig entfärbte. Nach 10 min Inkubation wurde das Lysat in ein neues Gefäß filtriert, anschließend mit 5 mL *Puffer BB* invertiert und mittels Vakuum bei 300 mbar durch den *QIAGEN Plasmid Plus spin Column* gefiltert. Um die

gewonnene DNA zu waschen wurden 0,7 mL *Puffer ETR* auf den Filter gegeben, wiederum mit Vakuum abgesaugt, 0,7 mL *Puffer PE* zugegeben und abermals mittels Vakuum abgesaugt. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde das *spin column* bei 10 000 *g* für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die DNA herauszulösen, wurde das *spin column* in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, 400 µL Milli-Q Wasser in die Mitte gegeben und für 1 min inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 10 000 *g* wurden die DNA-Konzentrationen mittels *NanoDrop* durch Messung der Extinktion für DNA/RNA (A260 nm) bestimmt. Verunreinigungen der Proben durch Proteine wurden standardmäßig durch die Messung des A260/A280 Verhältnisses überprüft, wobei bei einem Absorptionsgrad von 1,8 – 2,0 die DNA für weitere Versuche verwendet werden konnte.

2.3 Analysemethoden

2.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Basierend auf den Erkenntnissen aus der Lichtmikroskopie wurde das Transmissionselektronenmikroskop von MAX KNOLL und seinem damaligen Doktoranden ERNST RUSKA entwickelt. Die Grenzen des herkömmlichen Lichtmikroskops zeigte ERNST ABBES bereits Ende des 19. Jahrhunderts auf, denn er stellte fest, dass das Auflösungsvermögen der Mikroskope durch die Wellenlänge der verwendeten Sonde begrenzt ist. Bedingt durch Beugungseffekte eines optischen Systems, ist die Auflösung (der minimal detektierbare Abstand d_{\min} zweier Objekte) auf das Abbe'sche Auflösungsminimum begrenzt:

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{n \times \sin \alpha}$$

λ stellt die Wellenlänge der verwendeten Sonde und $n \times \sin \alpha$ die numerische Apertur (NA) dar. Die numerische Apertur kann als eine Art Öffnungswinkel eines Objektivs angesehen werden, wobei sich eine große Linsenöffnung positiv auf das Auflösungsvermögen auswirkt. Mit kommerziellen optischen Objektivlinsen kann eine numerische Apertur von 1,4 erreicht werden, wodurch die Auflösungsgrenzen dieser Systeme bei ca. 240 nm liegen, wenn von einer mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichts von 550 nm ausgegangen wird [43].

Erhöht man die NA, kann ein höheres Auflösungsvermögen erreicht werden. Da die Erhöhung der NA an technische Grenzen stößt, besteht eine weitere Möglichkeit darin, die Wellenlänge zu reduzieren. An dieser Stelle setzt die Entwicklung der Elektronenmikroskopie an. Wird das Licht durch Elektronen ersetzt, kann die Wellenlänge der eingesetzten Sonde um mehrere Größenordnungen reduziert werden. Beispielsweise besitzen Elektronen bei einer Energie von 200 keV eine Wellenlänge von rund 0,001 nm, was im Vergleich mit der Lichtmikroskopie ein enormes Auflösungsvermögen im subatomaren Bereich bedeutet. Moderne TEMs erreichen Auflösungen von ca. 0,1 nm, was einer NA von ca. 6×10^{-3} entspricht. Der Aufbau des TEMs ähnelt dem eines Lichtmikroskops und setzt sich zusammen aus einem Beleuchtungssystem, einem Kondensator, einem Vergrößerungssystem und einem Detektionssystem. Die Beleuchtung besteht aus einer Elektronenquelle Elektronenkanone, wie z. B. einer Wolfram-, Feldemissions- oder LaB₆-Kathode, aus der die Elektronen freigesetzt werden und mit Hilfe einer Anode auf ihre Endenergie beschleunigt werden (Abbildung 3). Das Präparat wird durch den Kondensator gleichmäßig ausgeleuchtet und der Elektronenstrahl durchdringt die Probe im Verlauf des Strahlengangs. Darunter befindet sich eine zweistufige Vergrößerungseinheit, die aus Projektions- und Objektivlinsen besteht und für die entsprechende Vergrößerung der Abbildung zuständig ist. Das Bild kann anschließend im Detektionssystem abgebildet werden, das meist aus einem Leuchtschirm oder einer CCD-Kamera besteht. Die Beschleunigungsspannungen der Elektronen liegen üblicherweise zwischen 80 und 300 keV. Da für die Bildentstehung im Elektronenmikroskop die Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe grundlegend ist, muss die Probe sehr dünn sein. Durchdringen die Strahl-Elektronen die Probe, führt dies zu Wechselwirkungen mit den Atomen der Proben. Dies hat zur Folge, dass ein Teil der Elektronen nach dem Passieren der Probe etwas von ihrer Primärenergie verlieren oder ihre Richtung geändert haben. Mit steigender Dicke der Probe bzw. Ordnungszahl des Materials nimmt die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung zu. Mit Hilfe der Objektivblende, die direkt unterhalb der Probe liegt, können Elektronen, die einer großen Winkeländerung unterliegen, ausgeblendet werden und tragen nicht mehr zur Bildentstehung bei. Aus diesem Grund werden Elemente hoher Ordnungszahl oder dicke Bereiche in der Abbildung dunkel dargestellt. Diese Kontrastentstehung wird auch Massen-Dicke-Kontrast genannt. Zur Bilderzeugung werden also nur die axialen Elektronen, die die Probe ohne große Wechselwirkungsverluste verlassen, herangezogen. Die Aufnahmen weisen dann meist einen hellen Hintergrund auf und werden als Hellfeld-Abbildung bezeichnet und die Probe erscheint entsprechend dunkel. Nutzt man hingegen Elektronen die stark gebeugt oder gestreut wurden, wird von

Dunkelfeld-Abbildungen gesprochen. Hierfür verschiebt man die Objektivblende auf eine außeraxiale Position. Die Dunkelfeldmethode wird häufig für kristalline Bereiche von Proben eingesetzt.

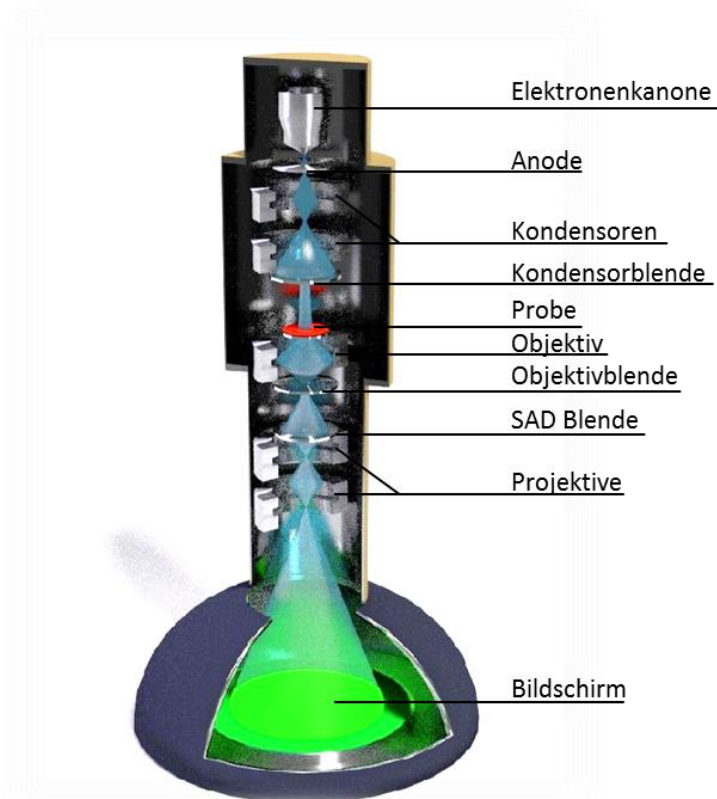


Abbildung 3: Strahlengänge eines Transmissionselektronenmikroskops; erstellt mit Blender™.

Die Probe im TEM wird von Elektronen durchstrahlt, wodurch ein Abbild auf einem Fluoreszenzschirm entsteht. Durch die Wechselwirkung der Probe mit dem Elektronenstrahl treten elastische und inelastische Streuungen auf, wobei elastisch gestreute Elektronen bei der Wechselwirkung mit der Probe kaum einem Energieverlust unterliegen [44]. Die Entstehung elastisch gestreuter Elektronen geht auf elektrostatische Wechselwirkungen mit der Kernladung zurück, wohingegen der Strahl bei der inelastischen Streuung umso stärker gestreut wird, je mehr der Strahl mit der Probe in Wechselwirkung tritt. Somit erfolgt die Wechselwirkung inelastisch gestreuter Elektronen an der Elektronenhülle der Atome [45]. Biologische Proben sowie Materialien aus leichten Elementen werden für die Bildentstehung mit Schwermetallen kontrastiert. Der Elektronenstrahl wird an eingelagerten Schwermetallen abgelenkt und das daraus resultierende Bild setzt sich aus den Graustufen zusammen, die durch verschiedene Elektronendichten der Probe entstehen. Bei

dunkleren Bereichen gelangen wenige Elektronen durch die Probe auf den Fluoreszenzschirm und bei helleren Bereichen treffen, durch die geringe Elektronendichte der Probe, mehr Elektronen auf dem Schirm auf.

Für die Analyse biologischer Proben im TEM ist eine spezielle Präparation notwendig. Die Proben müssen trocken, vakuumstabil, elektronentransparent und unempfindlich gegenüber dem Elektronenstrahl sein. Neben einer klassischen chemischen Fixierung (siehe 2.3.1.1) wird alternativ auch die Methode des Hochdruckgefrierens (engl. „high pressure freezing“, HPF) mit anschließender Gefriersubstitution eingesetzt (siehe 2.3.1.3). Der Vorteil physikalischer Fixierungen gegenüber chemischen Fixierungen liegt in der Reduktion von Artefakten, die bedingt durch Fixane wie Glutaraldehyd oder Formaldehyd entstehen und die natürlichen Strukturen der Proben beeinflussen bzw. verändern. Daher wird in dieser Arbeit bevorzugt die HPF Methode zur Präparation biologischer Proben eingesetzt.

2.3.1.1 Chemische Fixierung

Die klassische chemische Fixierung wird routinemäßig bei der Präparation von biologischen Proben in der Elektronenmikroskopie eingesetzt. Bei diesem Verfahren ist die Reproduzierbarkeit der Fixierung und Kontrastierung sehr gut, jedoch unterliegen die Proben präparationsbedingten Artefakten, Denaturierungen und Schrumpfungen, was häufig zu Veränderungen der Zellstrukturen führt.

Die Zellen wurden für die Präparation mit einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung für ca. 30 min bei 4 °C fixiert und mit 2% wässrigem OsO₄ kontrastiert. Danach erfolgte die Entwässerung der Proben über eine aufsteigende Ethanolreihe von 30%, 50%, 70% und 90% für jeweils 5 min. Bei der Entwässerung in 100% Ethanol erfolgte gleichzeitig eine Kontrastierung mit Uranylacetat (UA). Hierfür wurde eine gesättigte, alkoholische Uranylacetatlösung hergestellt (50 mg UA/1 mL Ethanol), filtriert und die Lösung für ca. 30 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Uranylacetatlösung durch reines Ethanol ersetzt und abermals für 30 min inkubiert. Im letzten Entwässerungsschritt wurde frisches Ethanol für 1 h zugegeben, bevor der Alkohol in drei Stufen (Verhältnis EPON/Ethanol: 30/70, 50/50, 70/30) durch das Einbettungsmedium EPON ausgetauscht wurde. Danach wurden die Proben mit reinem EPON über Nacht infiltriert und am nächsten Tag das EPON gegen frisches ausgetauscht. Die Polymerisation der Proben erfolgte für 2 – 3 Tage bei 60 °C.

2.3.1.2 Kontrastierung mit Schwermetallen

In der Elektronenmikroskopie werden Proben, die überwiegend aus leichten Elementen bestehen, vom Elektronenstrahl nur mit sehr geringer Wechselwirkung durchstrahlt, und es kommt lediglich zu einem geringen Kontrast. Dies wiederum erschwert die Differenzierung von Ultrastrukturen. Zur Erhöhung des Kontrasts werden Schwermetalle eingesetzt, die durch ihre hohe Elektronendichte für differenzierten, lokalen Kontrast sorgen. Prinzipiell sind dafür alle schweren Elemente geeignet. Die am häufigsten eingesetzten Schwermetalle, die zu einer guten Kontrastierung von biologischen Proben führen, sind dabei Osmiumtetroxid (OsO_4) und UA. Als vergleichsweise starkes Oxidationsmittel reagiert OsO_4 mit zahlreichen funktionellen Gruppen und Doppelbindungen. UA ist dagegen zur Kontrastierung von Carboxyl- und Phosphatgruppen geeignet [46].

2.3.1.3 Hochdruckgefrieren

Beim Hochdruckgefrieren (engl. „high pressure freezing“, HPF) wird die Probe mit einem Druck von ca. 2000 bar extrem schnell (binnen Millisekunden) tiefgefroren. Dabei wird die Kristallbildung des Wassers verhindert [47, 48].

Die mit Zellen bewachsenen Saphirscheiben (siehe B.2) wurden zur Stabilisierung und zum Schutz während des Einfriervorgangs in ein Alusandwich überführt. Dieses besteht aus zwei Aluminiumplättchen mit einer Vertiefung auf der Zelleseite von 0,2 mm und von 0,025 mm auf der Unterseite. Gelagert wurden diese Plättchen vor ihrer Verwendung in 1-Hexadecan, damit noch vorhandene Luft in den Kanten des Aluminiumplättchens vollständig entfernt wird, da diese den Einfriervorgang der Zellen beeinträchtigt. Die mit Zellen bewachsenen Saphirdiscs wurden aus dem Zellmedium entnommen und überschüssiges Medium mit einem Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurden sie kurz in 1-Hexadecan getaucht, um etwaige Luft und überschüssiges Medium zu entfernen [49]. Nach dem Hochdruckgefrieren wurden die Alusandwiches mit den Saphirscheiben in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend erfolgte die Gefriersubstitution im Austauscher mit dem Substitutionsmedium (siehe 2.3.1.4).

2.3.1.4 Gefriersubstitution und Einbettung der Zellen

Bei einer Temperatur von -90 °C wurden die gefrorenen Proben in ein Substitutionsmedium (siehe B.5.8) überführt, um das Wasser gegen ein Lösungsmittel auszutauschen, um die Zellen in das nicht wassermischbare Kunstharz EPON (siehe B.5.9) einzubetten. Zudem verhindert das Lösungsmittel die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellstrukturen zerstören. Der Austauschprozess dauert zwischen 16 und 20 h, wobei der Prozess im Bereich zwischen -90 °C und -80 °C am längsten verweilt, um den vollständigen Austausch des Wassers zu gewährleisten. Als Substitutionsmedium wurde hauptsächlich Aceton verwendet, da es für die in dieser Arbeit verwendeten biologischen Proben die beste Strukturhaltung in den TEM-Untersuchungen zeigte und zudem bei etwa -90 °C flüssig ist [50]. Für Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde hingegen Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt. Zur Kontrastierung wurden die Schwermetalle Uranylacetat (0,1%; Zusammensetzung siehe B.5.5) und wässriges OsO_4 [51] verwendet (0,2%; Zusammensetzung siehe B.5.4). Im letzten Teil der Substitution erfolgt die Erwärmung der Proben auf Raumtemperatur und anschließendem 3-maligen Waschen mit Aceton. Danach wird eine 1:1 Mischung aus Aceton und EPON für 2 – 4 h zugegeben, um die Proben mit Kunstharz zu infiltrieren. Schließlich wird dann die Mischung gegen reines EPON ausgetauscht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Saphirdiscs schließlich in frischem EPON ausgerichtet, eingebettet und bei 60 °C im Ofen für 3 Tage ausgehärtet.

2.3.1.5 Ultradünnschnitte

Nach dem Aushärten werden die Proben in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Kunstharzblöcke aus den Gefäßen zu lösen. Nun können die Saphirscheiben mechanisch von der Zellschicht abgelöst werden. Die Harzblöcke werden anschließend halbiert und zu einer Trapezform zurechtgeschnitten. Mit dem Ultramikrotom werden dann mittels Diamantmesser Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie von ca. 60 nm Dicke geschnitten. Dickere Schnitte für die Tomographie sowie für das CLSM werden bei einer nominellen Schnittdicke von ca. 200 nm präpariert. Durch Interferenzfarben konnten die Schnitte ihrer Dicke nach ausgewählt werden. Die Schnitte wurden von der Wasseroberfläche der Messerwanne abgenommen und auf Kupfer-Netzchen für die

Elektronenmikroskopie oder auf Deckgläser bzw. Objektträger für Immunfärbungen und histologische Färbungen überführt.

2.3.1.6 Tomographie

Um aus zweidimensionalen Abbildungen von Proben dreidimensionale Informationen zu generieren, wird die Tomographie in der Transmissionselektronenmikroskopie angewendet [52, 53]. Dabei können Proben bis zu 500 nm Dicke analysiert werden. Mit Hilfe des euzentrischen Goniometers wird die Probe gedreht und eine Kippserie erstellt. Jedes Bild der Kippserie wird aus einem anderen Winkel aufgenommen und besteht aus der zweidimensionalen Projektion der zu untersuchenden Probe. Durch eine Rückprojektion wird aus allen Bildern ein dreidimensionales Modell rekonstruiert [54]. Da der Halter die Probe bei hohen Kippwinkeln abschattet, wird maximal von 70° bis -70° gekippt, wodurch ein Teil der Probeninformation verloren geht („missing wedge problem“) [55]. Die Auswertungen der Bildserien sowie die 3D-Rekonstruktionen wurden mit dem Softwarepaket *IMOD* durchgeführt [56, 57].

2.3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Eine weitere analytische Methode der Transmissionselektronenmikroskopie stellt die energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. „energy dispersive X-ray spectroscopy“, EDX) dar. Durch die Emission charakteristischer Röntgenstrahlungen bei der Wechselwirkung der eingestrahnten Elektronen mit der Probe, können Rückschlüsse auf die lokale Elementverteilung der Probe gezogen werden.

2.3.3 Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS)

Bei der Elektronenenergieverlustspektroskopie (engl. „electron energy loss spectroscopy“, EELS) [58] wird die Energie der Primärelektronen gemessen, die sie bei der Wechselwirkung mit der Probe verloren haben. Wird die Probe durchstrahlt, werden Elektronen elastisch oder inelastisch am Kern gestreut. Elastische Streuungen werden überwiegend zur Kontrasterzeugung der Hellfeldabbildungen

genutzt, da die Elektronen kaum Energie verlieren. Die Elektronen bei inelastischen Streuungen verlieren dagegen Energie bei ihrer Wechselwirkung mit den Valenzelektronen. Diese Wechselwirkung ist Element-spezifisch und unterschiedlich intensiv. Ähnlich einem optischen Prisma können die Strahlelektronen entsprechend ihrer kinetischen Energie mit Hilfe von magnetischen Prismen aufgespaltet werden, sobald sie die Probe passiert haben. Die Energieabsorption der Probe nimmt ab einem bestimmten Wert erheblich zu und es werden mehr Elektronen mit elementspezifischem Energieverlust detektiert. Dieser spezifische Energieverlust entspricht der zur Ionisation des entsprechenden Atom-Elektrons benötigten Energie. Elektronen, die an der Entstehung der charakteristischen Absorptionskante beteiligt sind, werden bei der Methode der elementspezifischen Abbildung (engl. „element specific imaging“, ESI) für die Abbildung genutzt. Um selektiv Elektronen mit einem bestimmten Energieverlust $E \pm \Delta E$ zur Erzeugung eines Bilds nutzen zu können, kommt die schlitzförmige Blende in der energiedispersiven Ebene des Spektrometers zum Einsatz. Ein Bild der elementspezifischen Verteilung kann erzeugt werden, indem drei Bilder verschiedenen Energieverlusts aufgenommen werden. Zwei werden dabei vor der Absorptionskante (I_0 und I_1) und ein weiteres Bild beim Maximum (I_{\max}) der Absorptionskante aufgenommen. Die Untergrundintensität für einen Energieverlust wird bei I_{\max} aus I_0 und I_1 extrapoliert und vom Bild I_{\max} abgezogen.

2.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Mithilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) können Oberflächen sowie Morphologien von Proben analysiert werden. Die Art der Bildentstehung unterscheidet sich dabei wesentlich von Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie [59]. Der Elektronenstrahl rastert das abzubildende Objekt ab, die auftretenden Wechselwirkungen der Primärelektronen und der Probenoberfläche werden dann zur Erzeugung eines Bildes herangezogen. Ein Elektron kann beim Auftreffen auf die Probe Elektronen aus der Hülle der Atome herausschlagen (Sekundärelektronen, SE) oder reflektiert werden (engl. „back scattered electron“, BSE). Damit das Signal der BSE ausreichend ist, muss mit höheren Spannungen im Bereich 10–30 kV gearbeitet werden [60]. Elemente mit hoher Ordnungszahl erzeugen mehr BSE, was zu helleren Bildpunkten führt. Dagegen führen Proben mit niedrigeren Ordnungszahlen, wie Kohlenstoff, zu weniger BSE, wodurch dunklere Bildbereiche abgebildet werden. Mit Hilfe des BSE-Detektors können somit Rückschlüsse auf die

Materialzusammensetzung gezogen werden. Ein herausgeschlagenes Elektron führt zu einem Loch in der Elektronenhülle, das aus der höher liegenden Schale wieder aufgefüllt wird. Hierbei entstehen element- und schalenspezifische Röntgenstrahlen, die zur Bestimmung der Elementzusammensetzung mittels eines EDX-Detektors genutzt werden können (EDX, siehe 2.3.2). Mit speziellen Detektoren können zudem die verschiedenen Strahlungsarten detektiert werden. Die entstehenden SE dienen der Oberflächendarstellung und da an steileren Flächen und Kanten mehr Sekundärelektronen herausgelöst werden als an flachen Bereichen der Probe, kommt der bildgebende Kontrast zustande. Somit wird das entstehende Bild an den Stellen heller, an denen mehr SE von der Probe auf den Detektor treffen. Die Sekundärelektronen, die an der Bildentstehung beteiligt sind, können in drei Arten unterteilt werden [59]. Die Sekundärelektronen erster Art (SE 1) tragen hauptsächlich Bildinformationen und entstehen direkt durch den Primärstrahl [61, 62]. Durch rückgestreute Elektronen werden SE 2 erzeugt, die ebenfalls aus der Probe austreten. SE 3 entstehen durch energiereiche, rückgestreute Elektronen, die auf die Wand der Probenkammer treffen. SE 2 und SE 3 setzen die Bildqualität herab, lassen sich jedoch nicht verhindern.

2.3.5 Konfokale Laserrastermikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Laserrastermikroskopie basiert auf der 1957 patentierten Idee von MARVIN MINSKY. Durch Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Lasern spezifischer Wellenlängen und dem Einsatz einer konfokalen Blende (engl. „pinhole“) gelangt lediglich das Fluoreszenzlicht der Fokusebene zum Detektor, wodurch das betrachtete Objekt anhand von optischen Schnitten untersucht werden kann [63, 64]. Das Laserlicht trifft punktförmig auf das zu betrachtende Objekt, welches mit Hilfe beweglicher Rasterspiegel innerhalb der Fokusebene abgerastert wird. In der Abbildung 4 ist der Strahlengang eines CLSMs dargestellt. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann durch die konfokale Blende, die sich vor dem Detektor befindet, aus der Fokusebene detektiert werden. Die Blende erlaubt es, dass lediglich Strahlen aus der Fokusebene zum Detektor gelangen und Strahlen, die außerhalb des Fokus liegen, blockiert werden. Der Begriff konfokal bezieht sich auf das exakte Übereinanderliegen des Fokus der Objektebene und des Detektionsfokus. Im Allgemeinen werden Sekundärelektronenvervielfacher (engl. „photomultiplier tubes“, PMT) als Detektoren verwendet (siehe Abbildung 4). Diese nutzen den sogenannten Photoeffekt aus. Dabei wird aus der Photokathode ein Elektron freigesetzt, wenn ein Photon auftrifft. Dieses Elektron wird durch Einsatz

von meist mehr als 3 Dynoden vervielfacht [65]. Die entstehenden Sekundärelektronen treffen dann auf eine Anode, das verstärkte Signal wird ausgelesen und bildet letztendlich das ursprünglich aufgetroffene Photon ab.

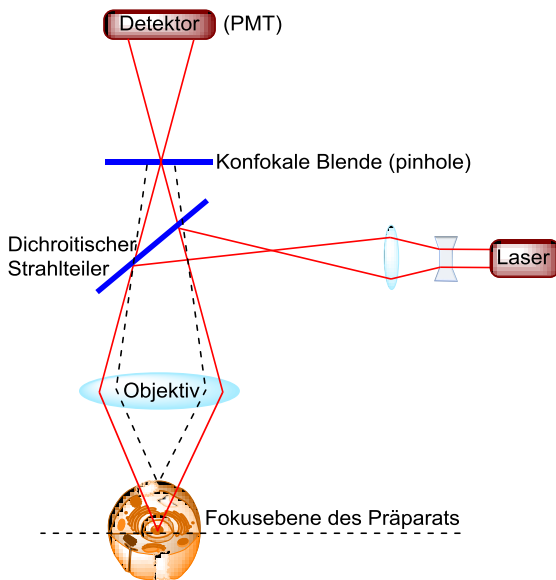


Abbildung 4: Schema des Strahlengangs eines CLSMs, zu sehen ist der Strahlengang von der Fokusebene in Rot und der Strahlengang außerhalb der Fokusebene in schwarz, durch die konfokale Blende erreicht nur das Licht der Fokusebene den Detektor; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra; modifiziert nach [66].

In der xy-Richtung (lateral) liegt die Auflösungsgrenze eines CLSMs bei ca. 200 nm und in der z-Richtung (axial) bei ca. 500 nm. Die Auflösung wird hauptsächlich durch das Objektiv und den Durchmesser der konfokalen Blende beeinflusst.

Auch hier ist das Auflösungsvermögen durch die NA festgesetzt, die durch den Brechungsindex n vom Medium zwischen der Objektivlinse und Deckglas und den halben Öffnungswinkel α vom Objektiv definiert ist. Die Auflösungsgrenze d kann unter Berücksichtigung der Wellenlänge des Lichts λ nach E. ABBE bestimmt werden [65]:

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{n \times \sin \alpha}$$

Die beste Auflösung wird mit Immersionsobjektiven erzielt, daher wurde für die meisten Proben ein Öl-Objektiv (HCX PL APO CS 63×/1.4-0.6) mit einer NA von 1,4 verwendet.

Das CLSM wurde hauptsächlich verwendet, um eine Aufnahme von Nanokapseln in Zellen nachzuweisen und diese zu detektieren. Die Zellen wurden auf verschiedene Weisen angefärbt, für eine bestimmte Zeit mit Nanokapseln oder Nanopartikel inkubiert und mit Hilfe eines Leica TCS SP5 II Mikroskops analysiert. Das Mikroskop verfügt über verschiedene Laser: Argon mit 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm; DPSS mit 561 nm; HeNe mit 594 nm und 633 nm. Die Aufnahmen der Bilder wurde mit der Software LAS AF 4.3 durchgeführt (Bildgröße 1024x1024 oder 512x512 und 8-bit-Pixel). Es wurden stets sequenzielle Scans durchgeführt, sodass jeder Farbstoff einer Probe einzeln nacheinander mit den entsprechenden Lasern angeregt und detektiert wurde. Dieses Verfahren verringert die Effekte von „Crosstalk“ bzw. Durchbluten. In Tabelle 2 sind die Laserlinien zur Anregung der Fluorophore und die an die verwendeten Fluorophore angepassten Emissionsbänder der PMTs zusammen eingetragen. Die Laserlinien wurden jeweils entsprechend des Anregungsmaximums ausgewählt und die Emissionsbänder wurden entsprechend dem Maximum der Fluoreszenz angepasst.

Tabelle 2: Auflistung der gewählten Laserlinien der PMTs zur Anregung bzw. Detektion der Fluorophore.

Fluorophor	Verwendete Laserlinie	$\lambda(\text{ex}_{\text{max}})$	$\lambda(\text{em}_{\text{max}})$
Alexa Fluor® 488	488 nm	490 nm	525 nm
CdTe-QDots	458 nm	UV	780 nm
CellMask™ Deep Red	633 nm	649 nm	666 nm
CellMask™ Green	488 nm	522 nm	535 nm
Cy5-Oligo	633 nm	649 nm	670 nm
GFP	488 nm	488 nm	510 nm
Oregon Green®	488 nm	490 nm	514 nm
SR101	561 nm	586 nm	605 nm
TMR	561 nm	554 nm	580 nm
QDot® 800	458 nm	UV	800 nm

2.3.6 Durchflusszytometrie mittels FACS®

Die Durchflusszytometrie (engl. „fluorescence activated cell sorting“, FACS®) wird häufig in der Biologie und Biomedizin zur Untersuchung von Zelleigenschaften eingesetzt. Zellsuspensionen werden dabei durch eine dünne Kapillare einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt und das entstehende Streulicht, das jede Zelle emittiert, wird gemessen. Beeinflusst wird das Streulicht durch die Größe der Zellen, die intrazelluläre Granularität sowie durch die Struktur der Zellmembranen. Gemessen werden zwei verschiedene Arten des Streulichts, das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht SSC (Sideward Scatter). Bewirkt wird das FSC durch die Beugung des Lichts, was als Maß für die Größe der Zellen dient, wohingegen das SSC durch die Brechung des Lichts hervorgerufen wird, was dem Maß der Granularität entspricht. Dadurch können Zellen unterschieden und klassifiziert werden bzw. gibt es Aufschluss über ihren Zustand. Werden FSC und SSC grafisch gegeneinander aufgetragen, lassen sich Vitalitätsmuster und Eigenschaften der Zellen in Bereiche gruppieren. Durch die entstandenen Bereiche lässt sich eine Zellsuspension qualitativ bewerten. Außerdem können fluoreszenzmarkierte Partikel und Kapseln durch den FL1-Kanal detektiert und den Zellen zugeordnet werden. Dabei gilt es, die Autofluoreszenz der Zellen zu beachten und mittels einer unbehandelten Zellsuspension einen Bezug herzustellen. Dadurch kann die aufgenommene Menge an Nanopartikeln bzw. Kapseln der Zellen bestimmt und durch eine zusätzliche Färbung mit 2 µg/mL Propidiumiodid (PI) die Vitalität der Zellen festgestellt werden.

Für die Untersuchungen der quantitativen Aufnahme von Nanopartikeln bzw. Kapseln wurden pro Well einer 24-Well-Platte ca. 100 000 MSCs bzw. DCs ausgesät und über Nacht im Brutschrank zu den bereits beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nachdem die Partikel zugegeben und für die entsprechende Zeit mit den Zellen inkubiert wurden, erfolgte das Ablösen der Zellen mit Trypsin für ca. 5 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt, das Trypsin mit 250 µL Medium inaktiviert und für 3 min bei 800 *g* zentrifugiert. Dann wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 1 mL kaltem PBS resuspendiert und die Suspension in FACS®-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bis zur Messung am *Partec CyFlow® ML* im Kühlschrank gelagert oder direkt gemessen. Die Auswertungen der Messungen erfolgten mit der Software FCSEXPRESS V4. Zur Berechnung wurde die Negativ-Kontrolle dabei auf einen Wert von 1% Aufnahme gesetzt.

2.3.7 Zytotoxizitätstest

Die Toxizität der Nanokapseln bzw. Nanopartikel wurde durch Zytotoxizitätstests bestimmt. Hierfür wurden ca. 100 000 – 200 000 MSCs oder DCs ausgesät und am nächsten Tag mit den entsprechenden nanopartikulären Systemen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2 µg/mL PI gefärbt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm und 40 mW am *Partec CyFlow® ML*. Um die Zytotoxizität der Nanokapseln zu bestimmen, wurde die Negativkontrolle als 100% vital definiert.

3 Ergebnisse & Diskussion

Um Nanopartikuläre Systeme in Zellen bildlich darstellen zu können, bietet sich eine Analyse mittels Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie an. Mit dem Fluoreszenzmikroskop können zahlreiche Strukturen von lebenden sowie fixierten Zellen markiert und detektiert werden, anschließend erfolgt im TEM die Analyse der ultrastrukturellen Details. Beide Methoden können daher Aufschluss über die Aufnahme und Verteilung von Nanopartikeln oder -kapseln in Zellen geben. Unter dem Begriff der korrelativen Mikroskopie werden dabei verschiedene Kombinationsmöglichkeiten beider Techniken zusammengefasst.

Zahlreiche Resultate konnten mit Immunfluoreszenzmarkern auf Cryo- sowie Harz-Schnitten mit anschließender detaillierter Analyse der Immunmarkierungen mittels EM erzielt werden [6, 8, 67]. Mit Cryo-TEM wurde die wohl beste Technik für die Immundetektion von TOKUYASU beschrieben [68, 69]. Die Methode bietet eine hohe Markierungseffizienz bei gleichzeitig guter Ultrastrukturhaltung, insbesondere in Hinsicht auf Membranen und Organellen. Diese Technik wurde bereits für die korrelative Mikroskopie an Zellen eingesetzt [70].

Die Schwierigkeit der korrelativen Mikroskopie besteht häufig darin, die im Fluoreszenzmikroskop analysierten Stellen im TEM wiederzufinden. Für Cryo-TEM wuchsen dafür Zellen direkt auf EM-Netzchen [71, 72]. Dabei wird ein hohes Maß an Korrelation und eine sehr gute Ultrastruktur erreicht, jedoch ist diese Methode lediglich auf sehr dünne Proben anwendbar. Somit ist es mit dieser Technik kaum möglich, die Gesamtheit der Zelle oder den Nukleus zu analysieren. Zudem ist es nicht möglich, Immunmarkierungen auf gefrorenen Proben durchzuführen. Obwohl Cyro-Schnitte von Zellen hervorragende Resultate ergeben, ist die Anwendung technisch sehr anspruchsvoll und nur für Labore geeignet, die spezialisiert auf elektronenmikroskopische Präparationen sind [73]. Außerdem kann eine chemische Fixierung der Proben zu Artefakten führen [74, 75] und damit die Detektion einiger zytoplasmatischer Proteine verhindern [73].

Als gute Alternative empfiehlt sich die Methode des HPF mit anschließender Gefriersubstitution und Harzeinbettung [75, 76], da hier die Strukturhaltung zytoplasmatischer Proteine deutlich besser ist. Außerdem ist die Ultramikrotomie bei Raumtemperatur einfacher anzuwenden als im gefrorenen Milieu. Um eine chemische Fixierung zu vermeiden, entwickelte VERKADE Techniken, Wiederfindungskordinaten bei adhärent kultivierten Zellen für HPF-Versuche einzubringen [3]. Die

Zellen wuchsen auf Saphirdisks und die Koordinaten wurden nachfolgend durch ein *finder grid* aus Metall von oben eingebracht. Die Verzögerung zwischen *live cell imaging*-Aufnahmen und HPF betrug hier lediglich 5 s, was eine gute Korrelation von Zellereignissen mit sich bringt. Diese Methode ist jedoch schwierig anzuwenden und kann zu Zellschädigungen führen. Des Weiteren sind die Koordinaten lediglich in wenigen Schnitten zu sehen [73]. SPIEGELHALTER entwickelte eine einfachere Methode, um die korrelative Mikroskopie bei lebenden Zellen anzuwenden. Eingebrachte Koordinaten nach anschließendem HPF konnten hier in 10 – 20 Schnitten erkannt werden und die Zeit von Lebendzell-Aufnahmen zum HPF betrug lediglich 8 s [73]. Dennoch ist die Methode nicht für jedes Labor anwendbar, da die Mikroskope und Einbettungsgeräte nah beieinander stehen müssen und sich Zellprozesse innerhalb von Millisekunden verändern können.

Aus den genannten Vor- und Nachteilen der verschiedenen Techniken ergab sich die Aufgabe, eine neue Methode zu entwickeln, um ein und dieselbe Probe auf einfachem Weg in beiden Geräten (CLSM und TEM) analysieren zu können. Hierfür wurden die Proben bereits vor der Betrachtung im CLSM präpariert und in Harz eingebettet, sodass keine weitere Präparation nach der Analyse am CLSM erforderlich war. Dünnschnitte sollten im CLSM betrachtet und Zellen ausgewählt werden. Anschließend sollte derselbe Schnitt im TEM analysiert und dieselben Zellen gefunden werden. Schritt für Schritt wird in den folgenden Abschnitten beschrieben, wie die Methode etabliert wurde und welche Vor- und Nachteile sich abzeichneten.

Alle hier verwendeten nanopartikulären Kapsel- und Partikelsysteme konnten zudem innerhalb von Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich war es möglich, mithilfe von verkapselten „Markern“ neben dem bildlichen Nachweis spezifische, elementanalytische Untersuchungen zur eindeutigen Identifikation durchzuführen. Denn polymere Kapseln können in Zellen aufgrund der kontrastreichen runden Zellstrukturen so gut wie gar nicht identifiziert werden. Weiterhin konnten neue Methoden zur Darstellung polymerer Kapseln im TEM gefunden werden, die Trocknungsartefakte verhindern und einfacher anzuwenden sind, als beispielsweise Cryo-TEM.

3.1 Korrelative Mikroskopie

Um Zellen für das CLSM anzufärben und die Fluoreszenz nach dem Einbetten in EPON [77-79] erhalten zu können, ist die Transfektion von Zellen eine gut geeignete Technik. Die Methode wurde als Alternative zur Immunmarkierung von Dünnschnitten zur Etablierung einer korrelativen Methode

ausgewählt. Nachfolgend sollen die Ergebnisse und Vorteile der Transfektion von Zellen für Analysen polymerer Nanoträgersysteme erläutert werden. Anschließend folgt die Vorstellung der Ergebnisse und Schwierigkeiten, die mit der Immunmarkierung von Ultradünnschnitten einhergehen.

3.1.1 Transfektion von Zellen

Mithilfe der Transfektion können beliebige Proteine in Zellen spezifisch mit einem synthetischen Fluoreszenzfarbstoff und mit hoher Quantenausbeute markiert werden. Verwendet wurden neben SNAP-Tag [80] auch HaloTags® [81], die beide entweder mit dem synthetischen Fluorophor *Alexa Fluor 488* oder *TMR* (Tetramethylrhodamin) gekoppelt sind und in lebenden MSCs sowie DCs exprimiert wurden. Unabhängig von der eingesetzten UA-Konzentration während der Substitution bleibt die Fluoreszenz synthetischer Fluorophore nach der Einbettung erhalten. Somit ist es möglich, die Proben mittels EM-Präparationsmethoden für die korrelative Mikroskopie vorzubereiten [82].

Das SNAP-Protein stellt dabei ein Derivat des ubiquitären Enzyms O-6-Alkylguaninalkyltransferase (AGT) aus Säugetierzellen dar, das im Organismus für die Reparatur von DNA-Defekten an Guanosinen zuständig ist. Ähnlich fungiert das SNAP-Protein bei der Markierung von Fusionsproteinen.

Für die Markierung muss die DNA-Sequenz eines Teilfragments der AGT in die DNA-Sequenz des Zielproteins in die Zelle eingebracht (z. B. durch Lipofektion) und ein beliebiger Fluoreszenzfarbstoff an das SNAP-Substrat BG-NH₂ chemisch gekoppelt werden. Anschließend wird der NHS-Ester von dem Fluoreszenzfarbstoff kovalent über die Aminogruppe am BG-NH₂ an das Substrat gebunden. Danach folgt die Diffusion des Substrat-Farbstoffkomplexes durch die Zellmembran. Trifft das Substrat in der Zelle auf das SNAP-Protein, spaltet das Fusionsprotein die im Substrat enthaltene Etherfunktion durch die enzymatische Funktion des AGT-Anteils. Guanin wird freigesetzt und das Fluorophor kovalent an das spezifische Protein gebunden [83, 84]. Die meisten SNAP-Tag-Substrate sind Benzylguanin-Derivate, aber auch Chlorpyrimidin-Derivate werden eingesetzt. Ein Beispiel für ein Chlorpyrimidin-Derivat stellt das hier verwendete Substrat *SNAP-Cell® TMR-Star* dar, die Reaktion ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

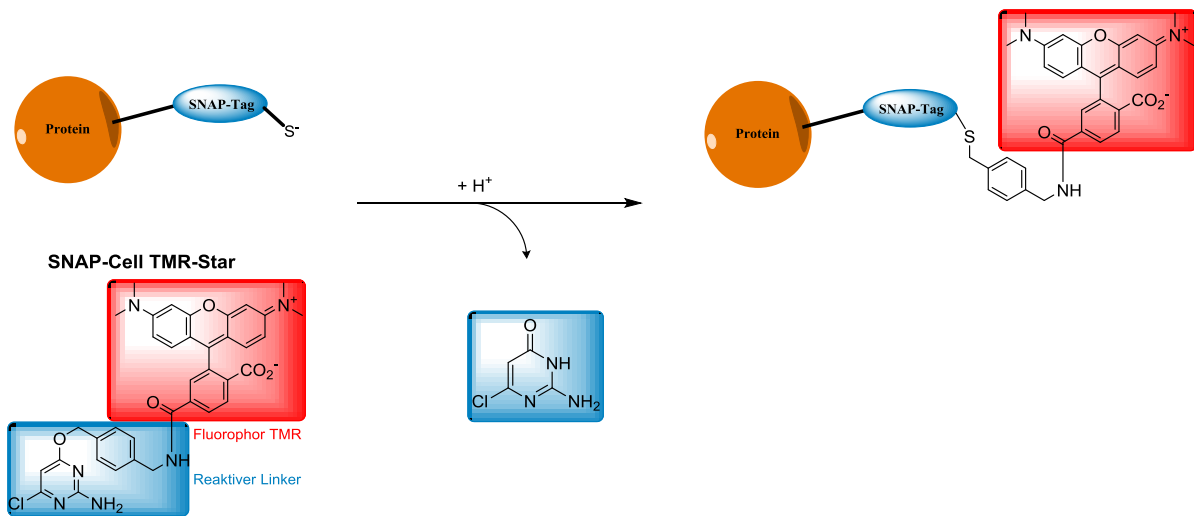


Abbildung 5: Schema der Reaktion von SNAP-Cell® TMR Star mit dem SNAP-Tag-Fusionsprotein; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra; modifiziert nach [85] NEB.

Bei HaloTags® ist das Funktionsprinzip gleich, es handelt sich dabei allerdings um ein modifiziertes Enzym aus Bakterien (Halogenalkan-Dehalogenase), welches als Hydrolase wirkt. Es kann an beliebige synthetische HaloTag®-Liganden kovalent binden und mit einem Protein der Wahl fusionieren [86]. Die synthetischen Liganden bestehen aus reaktiven Chloralkan-Linkern, an denen funktionelle Gruppen, wie Fluorophore, gebunden werden [81, 87, 88].

Für die Versuche wurden MSCs mit Hilfe von *Lipofectamine® 3000* transfiziert. Bei der verwendeten Plasmid-DNA handelte es sich zunächst um Kontroll-Plasmide (*pSNAPf-ADRβ2*), die ein Gen für das Histon H2B Protein trugen, welches an einen SNAP-Tag gekoppelt war. Wird also das Protein von den Zellen exprimiert, kann das Fusionsprotein durch Zugabe eines *SNAP-Cell®* Substrates ein Fluoreszenzsignal abgeben.

Die MSCs wiesen nach der durchgeführten Transfektion mit den Kontroll-Plasmiden im *live cell imaging* Fluoreszenzsignale auf (siehe Abbildung 6). Zu sehen sind die Zellen auf einem Wiedererkennungsmuster, das sich am Boden eines *Ibidi* befand. Um die Fluoreszenzerhaltung nach der Polymerisation des Harzes zu überprüfen, wurden die Zellen einer chemischen Fixierung direkt im *Ibidi* unterzogen und in EPON eingebettet. Danach wurde der gesamte Block im CLSM betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz der Zellen erhalten bleibt (siehe Abbildung 7). Allerdings erwies sich die Detektion der Zellen bzw. des richtigen Fokus im Harz schwieriger als im *live cell imaging*. Die Fluoreszenz fällt zudem durch die Einbettung etwas schwächer aus, dennoch konnten die Details der Zellen erkannt werden.

Anschließend wurden Ultradünnschnitte mit Dicken von 500 nm, 200 nm und 1000 nm angefertigt, auf Deckgläser überführt und im CLSM betrachtet. Die Zellen konnten in allen Schnitten detektiert werden, wobei die Fluoreszenz bei 200 nm Schnitten am geringsten war. Die detailreichste Zellstruktur konnte in den ersten Schnitten (500 nm) detektiert werden, da sich die Zellen hier direkt am Boden des Deckglases befanden. Nachfolgende 200 nm und 1000 nm dicke Schnitte vom selben Harzblock waren folglich in höheren Zellebenen, wo kaum mehr Zellstrukturen zu erkennen waren (siehe Abbildung 8).

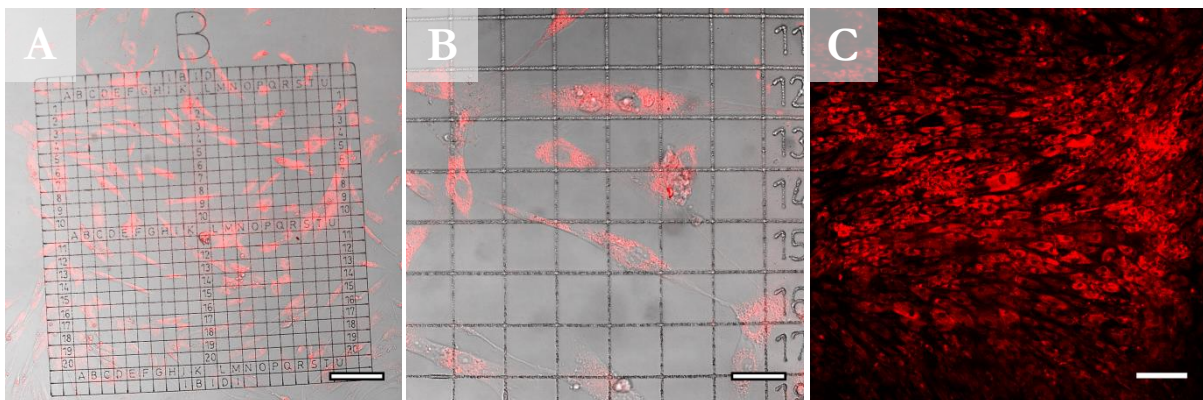


Abbildung 6: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_T-ADRB₂. Zu sehen sind die Zellen im live cell imaging in Ibdis mit Wiedererkennungsmuster im Glasboden, A & B: Überlagerung des Fluoreszenzsignals von SNAP-Cell® TMR-Star mit der Hellfeldaufnahme, C: Fluoreszenzsignal der Zellen von SNAP-Cell® TMR-Star; Maßstab A und C: 200 µm, B: 50 µm.

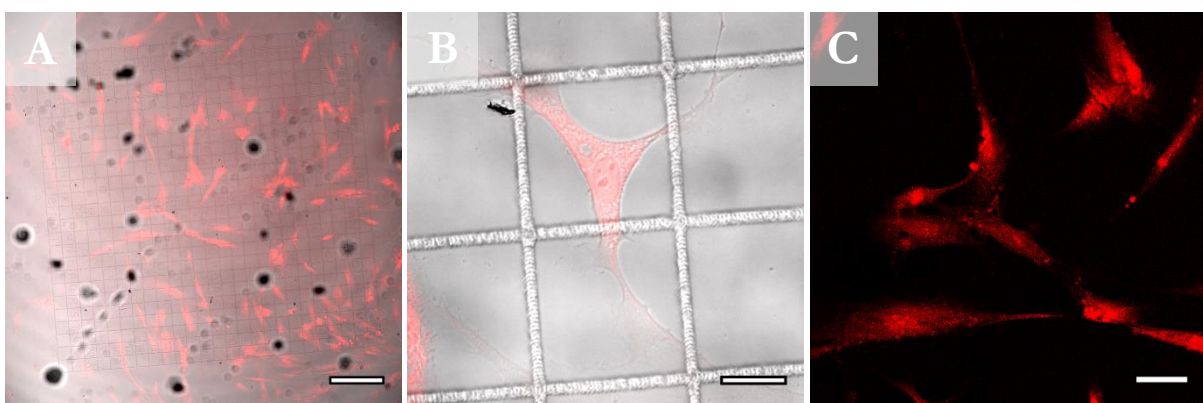


Abbildung 7: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_T-ADRB₂. Zu sehen sind die Zellen eingebettet in EPON in Ibdis mit Wiedererkennungsmuster im Glasboden, A & B: Überlagerung des Fluoreszenzsignals von SNAP-Cell® TMR-Star mit der Hellfeldaufnahme, C: Fluoreszenzsignal der Zellen von SNAP-Cell® TMR-Star; Maßstab A: 200 µm, B: 20 µm, C: 50 µm.

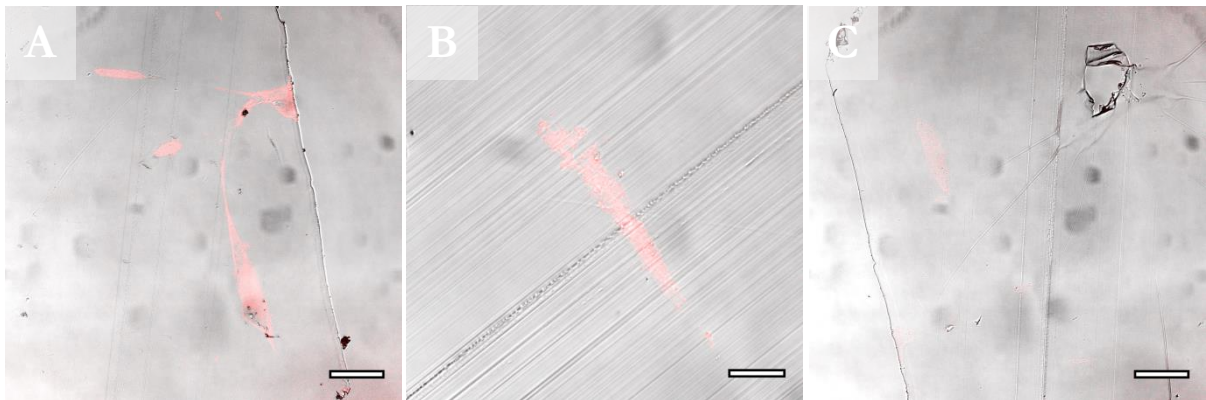


Abbildung 8: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_F-ADRB₂. Zu sehen sind die Zellen eingebettet in EPON auf Schnitten, Überlagerung des Fluoreszenzsignals von SNAP-Cell® TMR-Star mit der Hellfeldaufnahme A: 500 nm Schnitt, B: 1000 nm Schnitt; C: 200 nm Schnitt; Maßstab A und C: 50 µm, B: 20 µm.

Für Analysen im TEM sind Schnitte mit Dicken von 60 nm bis 200 nm optimal. Daher wurden weitere Schnitte mit Dicken von 200 nm und 60 nm transfizierter, in EPON eingebetteter Zellen angefertigt und mit dem CLSM untersucht. Auf 200 nm Schnitten, die mit höheren Vergrößerungen zeitnah analysiert wurden, konnten detailreiche zelluläre Strukturen erkannt werden (siehe Abbildung 9). Mithilfe dieser Technik konnte ein und dieselbe Zelle in aufeinanderfolgenden Dünnschnitten detektiert werden (siehe Abbildung 10). Der Zellkern sowie Vesikel sind in diesen drei Schnitten sehr gut erkennbar. Es ist jedoch festzustellen, dass das Fluoreszenzsignal mit der Zeit schwächer wird und dadurch kaum mehr Zellen identifiziert werden können. Nach längerer Lagerung von mehr als 2 Wochen konnte das Fluoreszenzsignal zwar immer noch detektiert werden, war aber zu schwach, um Details der Zellen erkennen zu können (siehe Abbildung 11).

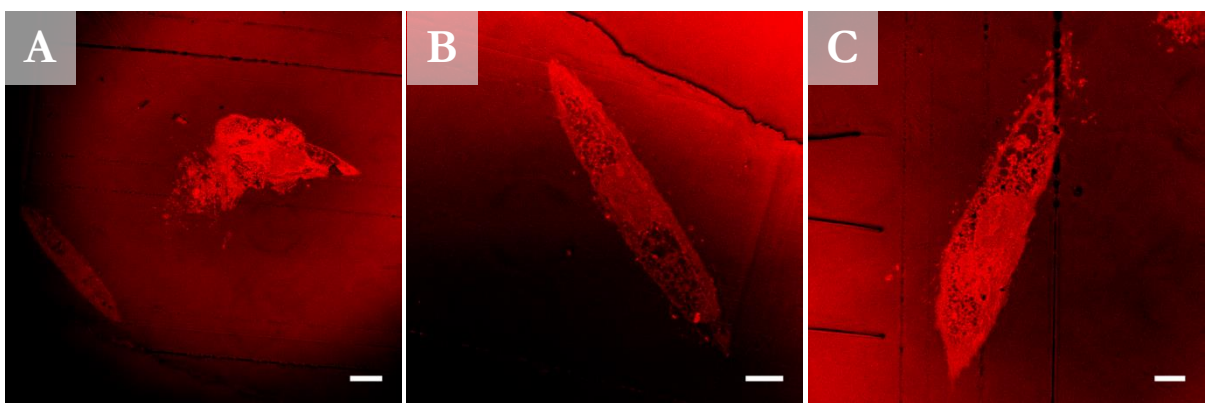


Abbildung 9: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_F-ADRB₂ in 200 nm dicken Schnitten. Abgebildet ist das Fluoreszenzsignal der Zellen mit SNAP-Cell® TMR-Star, die Zellstrukturen sind deutlich erkennbar; Maßstab: A: 20 µm, B und C: 10 µm.

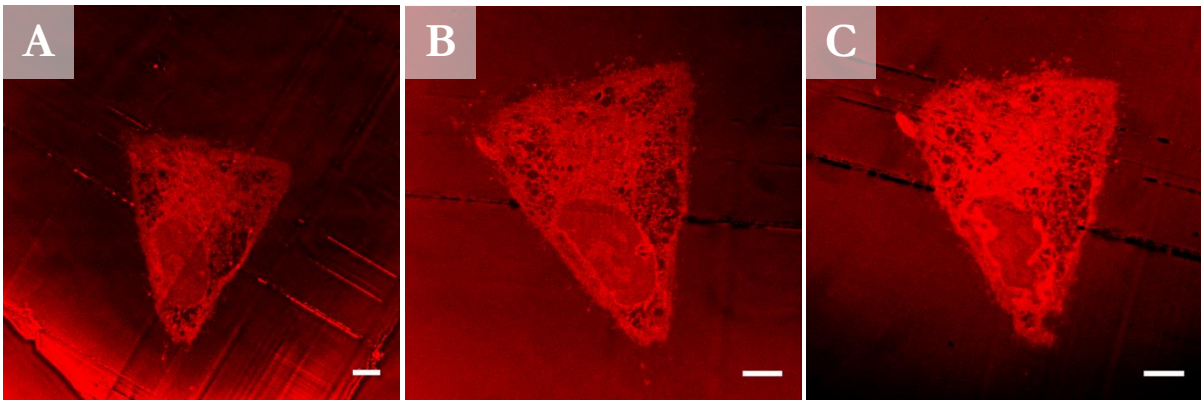


Abbildung 10: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP₇-ADRB₂ in 200 nm dicken Schnitten. Abgebildet ist das Fluoreszenzsignal einer Zelle in 3 aufeinanderfolgenden Schnitten mit SNAP-Cell® TMR-Star, die Zellstrukturen sind deutlich erkennbar; A: Schnitt 1, B: Schnitt 3, C: Schnitt 4; Maßstab: 10 µm.

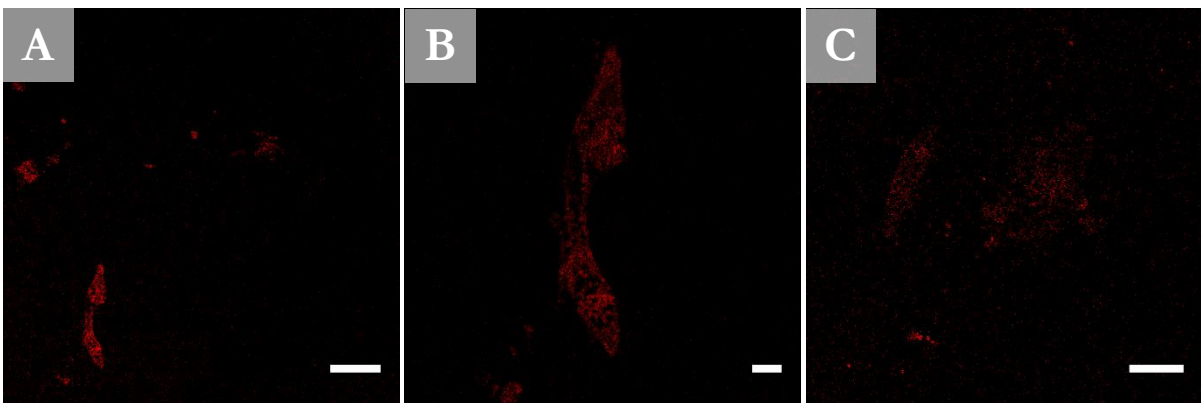


Abbildung 11: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP₇-ADRB₂ in 200 nm dicken Schnitten. Abgebildet ist das Fluoreszenzsignal der Zellen nach Lagerung der Schnitte über 2 Wochen mit SNAP-Cell® TMR-Star, die Zellstrukturen sind deutlich erkennbar; A und B: 200 nm Schnitte, C: 60 nm Schnitt; Maßstab: A: 50 µm, B: 10 µm, C: 20 µm.

Um die analysierten Schnitte im Elektronenmikroskop betrachten zu können, mussten die Schnitte von den Deckgläsern gelöst werden, da im TEM nur geeignete Träger-Netzchen eingesetzt werden können. Dazu wurden die Schnitte mit Hilfe von Polyacrylsäure vom Deckglas abgelöst (siehe B.4). Die Schnitte konnten so unbeschadet vom CLSM ins TEM übertragen werden. Für die Korrelation mit dem TEM wurden vorher Übersichtsbilder der fluoreszierenden Schnitte sowie Hellfeldaufnahmen am CLSM erstellt, die zur Orientierung und Lage der Zellen für die Analyse im TEM genutzt wurden. In der Übersicht sind zahlreiche Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 12 A und Abbildung 13 A). Die Hellfeldaufnahme (siehe Abbildung 12 B und Abbildung 13 B) zeigt denselben Schnitt mit markanten Schnittmustern des Diamantmessers, was sich für die Analyse im TEM als äußerst nützlich erwies (siehe Abbildung 12 C und Abbildung 13 C). So war es möglich, dieselben Zellen auf einem Schnitt zu

detektieren und die Strukturen bei höheren Vergrößerungen zu betrachten. Nachteilig sind jedoch die Kupferstege des TEM-Netzchens, wodurch Zellen teilweise verdeckt werden. Hier sind Netzchen ohne Stege oder mit größeren Feldern von Vorteil.

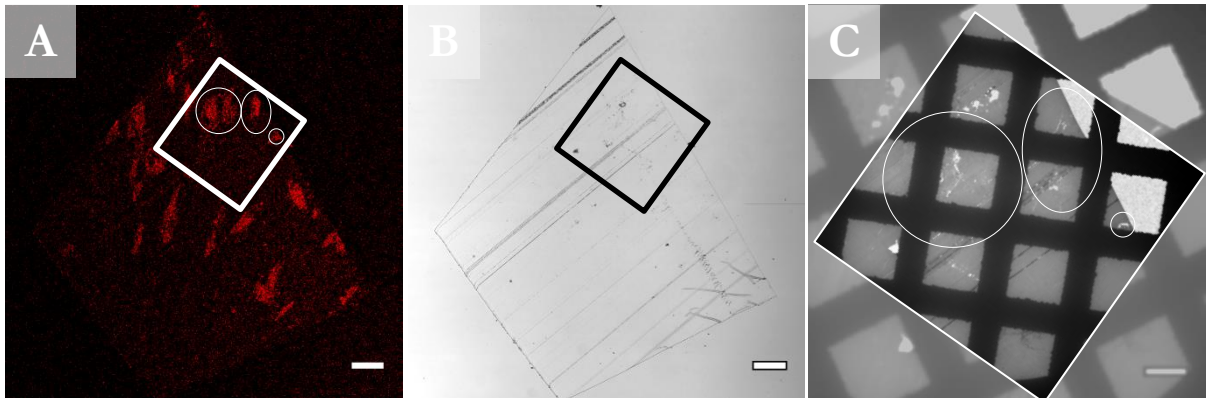


Abbildung 12: Übersichtsbilder für die Korrelation von CLSM und TEM, A: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_F-ADRB₂. Zu erkennen ist das Fluoreszenzsignal von SNAP-Cell® TMR-Star, B: Hellfeldaufnahme des selben Schnittes, C: TEM-Aufnahme des selben Schnittes nach Ablösen vom Deckglas und Überführen auf ein TEM-Netzchen, die Markierungen zeigen dieselben Zellen wie in A, das TEM-Bild (Original: mattiert im Hintergrund) wurde zum besseren Vergleich in die Orientierung der Übersichtsschnitte gedreht; Maßstab: A und B: 100 µm, C: 30 µm.

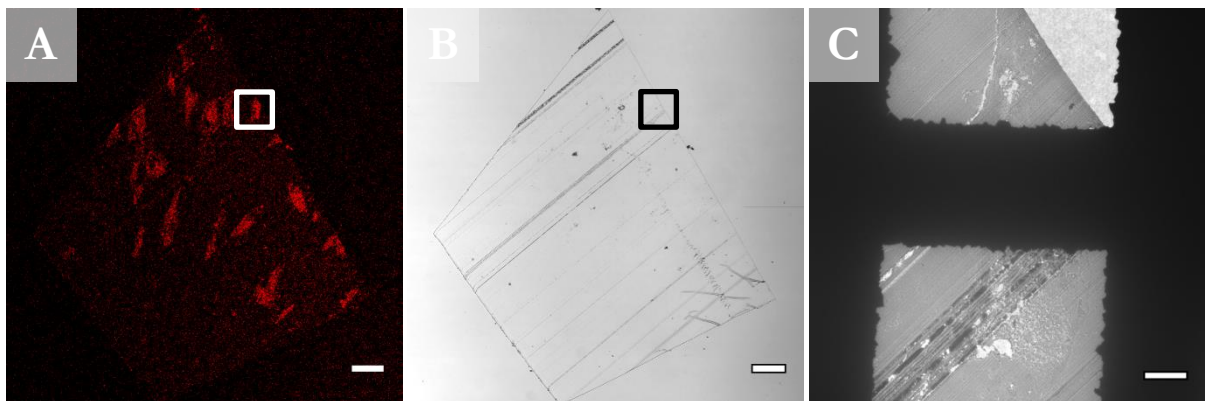


Abbildung 13: Übersichtsbilder für die Korrelation von CLSM und TEM, A: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP_F-ADRB₂. Zu erkennen ist das Fluoreszenzsignal von SNAP-Cell® TMR-Star, B: Hellfeldaufnahme desselben Schnittes, C: TEM-Aufnahme desselben Schnittes nach Ablösen vom Deckglas und Überführen auf ein TEM-Netzchen, der Ausschnitt zeigt dieselbe Zelle wie in A; Maßstab: A und B: 100 µm, C: 10 µm.

Für weitere Versuche wurden anstatt der Kontroll-Plasmide andere DNA-Plasmide eingesetzt (siehe 2.1.3.1), die beispielsweise zur Markierung von Proteinen wie Tubulin oder Clathrin eingesetzt werden und dadurch eine spezifische Analyse dieser Strukturen ermöglichen.

Nach der Plasmid-DNA-Isolation aus Bakterien (siehe 2.2.3) wurden die exprimierten Fusionsproteine mittels Transfektion von MCSs auf ihre Funktionsfähigkeit im *live cell imaging* am CLSM überprüft und mit dem Kontroll-Plasmid verglichen. Bei allen Fusionsproteinen konnten die Zellen anhand des Fluoreszenzsignals detektiert werden, somit waren diese für die Transfektion der Zellen geeignet (siehe Abbildung 14).

Die eingesetzten Fusionsproteine wurden ubiquitär in den MSCs exprimiert, denn die DNA-Plasmide wurden primär zur Etablierung der Methode ausgewählt, um die Zellen in ihrer Gesamtheit identifizieren zu können. Ein Vergleich der verschiedenen Proteine zeigte dennoch Unterschiede auf. So markierte beispielsweise das Protein *Tubulin-C-18* (siehe Abbildung 14 C) das gesamte Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle, an dem das Protein beteiligt war und konnte hauptsächlich als fadenförmiges Signal bis hin in die Ausläufer der Zellen erkannt werden. Bei *Clathrin-15* konnte dagegen beobachtet werden, dass Vesikel markiert wurden, was durch runde Strukturen in Abbildung 14 B zu erkennen ist. Clathrin ist an Einstülpungen der Zellmembranen sowie an der Bildung von Vesikeln beteiligt [89], was die Markierungen im Versuch bestätigten. Da mittels Transfektion jedes beliebige Protein für die Markierung der gewünschten Struktur von Zellen eingesetzt werden kann, eignet sich die Methode sehr gut für die Anwendung in der korrelativen Mikroskopie nanopartikulärer Systeme. So können beispielsweise gezielt Proteine gewählt werden, die lediglich an bestimmten Membranen, Endosomen oder Lysosomen vorkommen, um die Aufnahmemechanismen und Verteilung von polymeren Nanokapseln in Zellen bildlich nachweisen zu können.

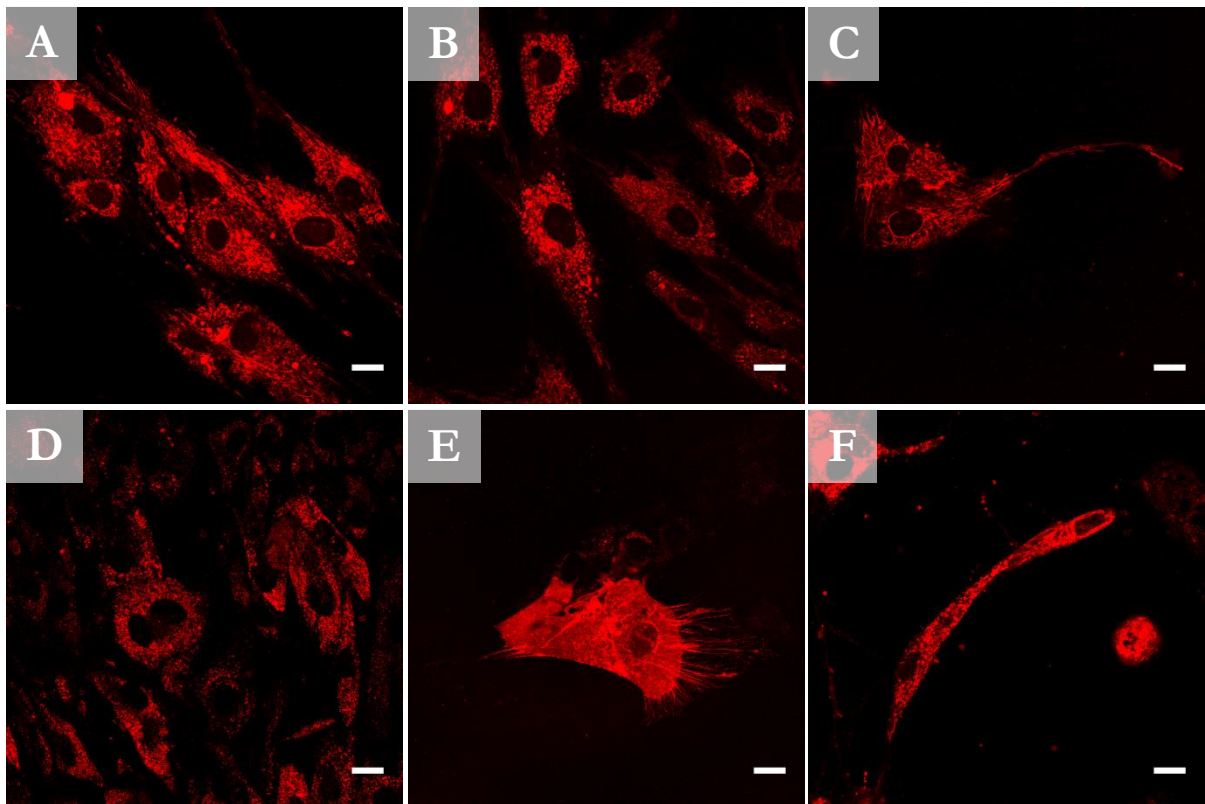


Abbildung 14: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit den isolierten Plasmiden aus Bakterien sowie dem Kontroll-Plasmid pSNAP₇-ADRB₂ (F). Abgebildet sind die Zellen im *live cell imaging* mit deutlich erkennbaren Zellstrukturen entsprechend ihres fluoreszierenden Fusionsproteins durch das Fluoreszenzsignal SNAP-Cell® TMR-Star bzw. HaloTag® TMR; A: ALK1-C-18, B: Clathrin-15, C: Tubulin-C-18, D: HaloTag-A2A-adenosine receptor, E: HaloTag-beta2-adrenergic receptor, F: pSNAP₇-ADRB₂ Control Plasmid; Maßstab: 20 µm.

Es konnte der Ansatz einer neuen Methode für die korrelative Methode etabliert werden, indem mittels Transfektion synthetische Fluorophore zur spezifischen Markierung in Zellen eingebracht wurden und deren Fluoreszenz auch nach der Präparation im Harz erhalten blieb. Dünnschnitte wiesen somit fluoreszierende Signale der Zellen auf und konnten im Anschluss mit Hilfe von Polyacrylsäure vom Deckglas gelöst werden, ohne Schäden an Schnitten oder Zellen zu verursachen. Im TEM konnten dieselben Zellen detektiert werden und dies ermöglicht damit eine Analyse der Details.

3.1.2 Immunmarkierung von Ultradünnschnitten

Abhängig von den spezifischen Anforderungen der Labore gibt es zahlreiche Methoden der Probenpräparation für die korrelative Mikroskopie. Am Einfachsten und Unkompliziertesten ist dabei die Markierung von Dünnschnitten [90].

Zu Beginn der Methodenetablierung wurde daher auf die Immunmarkierung von Dünnschnitten zurückgegriffen. Für erste Überprüfungen der Funktionsfähigkeit der verwendeten Antikörper wurden Ultradünnschnitte von MSCs in EPON (kontrastiert mit UA und OsO₄) angefertigt, auf Deckgläser überführt und mit den primären Membran-Antikörpern *Anti-CD63* und *Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase* inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der *Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse*-Antikörper verwendet. Wurde die Immunfärbung mit *Anti-CD63* am CLSM analysiert, konnten Zellen auf den Schnitten detektiert werden (siehe Abbildung 15). Die Fluoreszenz der Zellen war meist schwach und nur einige Stellen fluoreszierten stark, was vermutlich auf die starke Strukturvernetzung des EPONs zurückzuführen ist. Dadurch waren womöglich nur wenige freie Epitope für die Antikörperbindung zugänglich und die Strukturen der Zellen waren kaum erkennbar. Einige Schnitte zeigten kein Fluoreszenzsignal, möglicherweise waren die Schnitte bereits außerhalb der Zellebene oder die Epitope waren zu stark vernetzt und für die Antikörper unzugänglich (Daten nicht gezeigt). Ähnlich fielen die Immunmarkierungen von MSCs mit dem Plasmamembran-Marker *Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase* aus (siehe Abbildung 16). Einige Schnitte, die aus dem gleichen Block wie im Experiment mit *Anti-CD63* stammten, wiesen ebenfalls Fluoreszenzsignale auf und andere nicht. Entweder waren, wie beim Versuch mit *Anti-CD63* bereits erwähnt, keine Zellen auf den Schnitten vorhanden oder auch hier vernetzte das Einbettungsmedium die Epitope so stark, dass keine Anbindungsmöglichkeiten mehr für die Antikörper vorhanden waren. Da es sich um Schnitte desselben Blocks handelte, wie bei der Markierung mit *Anti-CD63*, liegt die Vermutung nahe, dass sich auf den Schnitten keine Zellen befanden.

Es wurde ein weiterer Versuch mit Schnitten von in EPON eingebetteten HeLa-Zellen durchgeführt. Die Ultradünnschnitte weisen Fluoreszenzsignale auf, wodurch Zellumrisse und Ausläufer gut zu erkennen sind (siehe Abbildung 17). Die Proben wurden ohne OsO₄ als Kontrastierungsmittel eingebettet, um die Immunfärbung zu verbessern. Das Schwermetall-Kontrastierungsmittel OsO₄ wirkt als sehr starkes Fixativ [91] und Oxidationsmittel [92]. Es kann Veränderungen in Epitopen hervorrufen, was wiederum zu einer Beeinträchtigung von Immunmarkierungen führen kann [93].

Jedoch fiel die Fluoreszenzmarkierung bei den HeLa-Zellen ebenso inhomogen aus, wie bei den MSCs. Für eine Analyse von Zellen und Nanokapseln ist die Immunmarkierung auf EPON Schnitten daher kaum geeignet.

Epoxy-Monomere vernetzen sich während der Polymerisation mit der Zellstruktur, wodurch ein Copolymer aus Harz und Molekülen gebildet wird [94-99]. Biologisches Material, das in EPON eingebettet wurde, lässt sich dadurch sehr gut und leicht schneiden. Die Methode sorgt für eine außerordentlich gute Morphologieerhaltung der Proben, wobei die Antigenität jedoch häufig beeinträchtigt wird, wie in den gezeigten Versuchen zu erkennen ist. Es konnten daher kaum Strukturen der Zellen sowie die Lage von Vesikeln oder Zellkernen erkannt werden, was eine Untersuchung von Details oder Nanokapseln unmöglich macht.

Im Gegensatz zu Epoxy-Harzen vernetzen Methacrylate durch radikalische Kettenreaktionen, wodurch lediglich die Monomere miteinander polymerisieren [94, 96]. Biologische Komponenten werden somit in einem Netzwerk aus Polymerharz eingebettet und nicht mit den Harzen vernetzt. Durch diese zugänglichere Struktur und durch eine höhere Hydrophilie als bei EPON sind die Markierungseigenschaften mit Antikörpern bei der Einbettung mit Methacrylaten besser. Die Verwendung von Methacrylaten, wie beispielsweise Lowicryle K4M, K11M, HM20 oder HM23 [100-105], stellt somit, was die Antigenzugänglichkeit angeht, eine gute Alternative dar.

Da jedoch die Zellstrukturerhaltung für das TEM eine entscheidende Rolle bei der Analyse von Nanokapseln spielt und EPON bekannt dafür ist, die Zellstruktur in Kombination mit HPF am besten zu erhalten [106], wurden keine Methacrylate als Einbettungsharz verwendet.

Somit galt es, eine alternative Methode zur Immunmarkierung zu finden, bei der die Zellen nach der Einbettung in EPON eine homogene Fluoreszenz aufwiesen. In der Anwendung der Transfektion, die in den Kapiteln 2.1.2 und 3.1.1 beschrieben wurde, wurde eine solche Methode gefunden und konnte für die Etablierung einer neuen und einfach anzuwendenden korrelativen Methode genutzt werden.

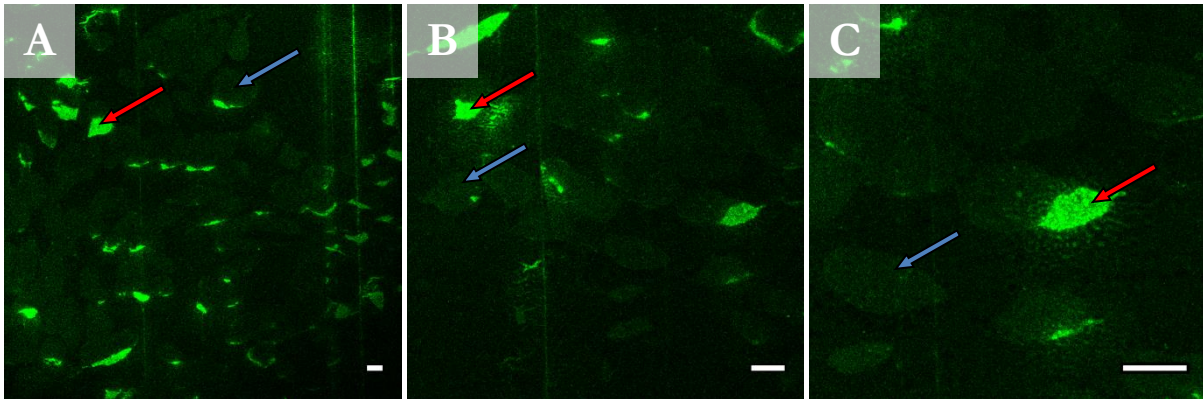


Abbildung 15: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter MSCs mit Anti-CD63-Antikörpern. Zu sehen sind die in EPON eingebetteten Zellen auf Ultradünnschnitten, die Fluoreszenzmarkierung mit dem sekundären Alexa Fluor® 488 Anti-Maus-Antikörper fiel teilweise schwach aus (blaue Pfeile) und einige Stellen fluoreszierten stark (rote Pfeile); Maßstab: 10 µm.

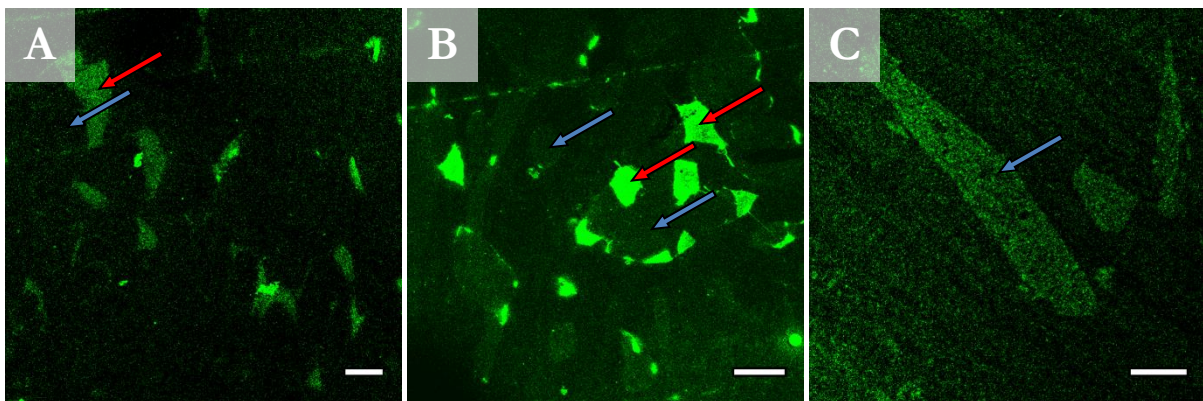


Abbildung 16: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter MSCs mit Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase-Antikörpern. Abgebildet sind die in EPON eingebetteten Zellen auf Ultradünnschnitten, die Fluoreszenzmarkierung mit dem sekundären Alexa Fluor® 488 Anti-Maus-Antikörper fiel teilweise schwach aus (blaue Pfeile) und einige Stellen fluoreszierten stark (rote Pfeile); Maßstab: A und C: 10 µm, B: 20 µm.

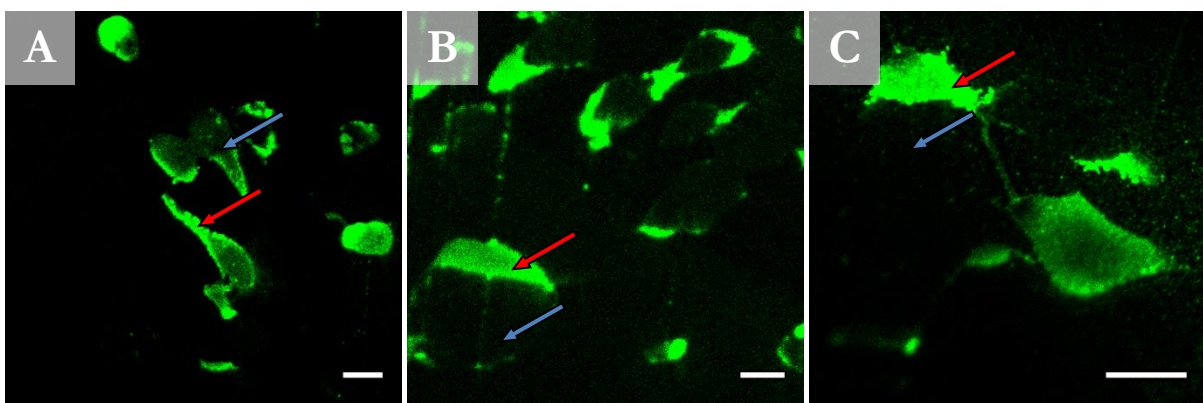


Abbildung 17: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter HeLas mit Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase-Antikörpern. Abgebildet sind die in EPON eingebetteten Zellen auf Ultradünnschnitten, die Fluoreszenzmarkierung mit dem sekundären Alexa Fluor® 488 Anti-Maus-Antikörper fiel teilweise schwach aus (blaue Pfeile) und einige Stellen fluoreszierten stark (rote Pfeile); Maßstab: 10 µm.

3.2 Direkter Nachweis von polymeren Nanokapseln

In dieser Arbeit wurden erstmalig Nanokapseln in Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie anhand ihrer Morphologie sowie ihrer elementaren Zusammensetzung nachgewiesen. Rein visuelle Nachweise von polymeren Kapseln in Zellen geben keinen direkten Nachweis, ob es sich tatsächlich um die Kapseln oder um zelluläre Strukturen handelt, da die Zellstrukturen im TEM in rundlicher Form und kontrastreich abgebildet werden und damit den Kapseln sehr ähneln. Im Fluoreszenzmikroskop können die Fluoreszenzsignale ebenfalls keinen direkten Nachweis liefern, ob sich tatsächlich die Kapseln in den Zellen befinden oder ob es sich lediglich um den Fluoreszenzfarbstoff handelt, der sich beispielsweise durch den „Kiss-and-Run“ Mechanismus vom Partikel getrennt hat [107]. Um einen direkten Nachweis für polymere Nanokapseln im TEM zu erhalten, wurden hier erstmals elementspezifische Analysetechniken der Elektronenmikroskopie angewendet. Als Modellkapseln wurden hierfür Polyharnstoffkapseln verwendet, die zur Analyse im TEM entweder Gadobutrol oder fluoreszierende Quantenpunkte (engl. „Quantum dots“, QDots) enthalten. In den folgenden Kapiteln wird auf die Charakterisierung der Kapseln, den spezifischen Nachweis sowie auf die Wechselwirkung der Nanokapseln mit Zellen eingegangen.

3.2.1 Charakterisierung von Polyharnstoffkapseln

3.2.1.1 Größe, Zetapotenzial, Feststoffgehalt

Die Charakterisierung der Kapseleigenschaften wurde vor dem Einsatz in Zellversuchen von Isabel Schlegel durchgeführt. Auf die Methoden wie dynamische Lichtstreuung (DLS), Zetapotenzial und Fluoreszenzbestimmung mittels Mikrotiterplattenleser wird nicht weiter eingegangen.

Es wurden acht verschiedene Kapseltypen verwendet (siehe Tabelle 3), da die Kapseln in Wasser nach einer Lagerung von mehr als 4 Wochen Agglomerate bildeten und aufgrund dieses Alterungsprozesses entweder neue Kapseln synthetisiert oder Kapseln neu aus Cyclohexan in Wasser überführt wurden. Bei Proben mit dem Indexzusatz „-2“ handelt es sich lediglich um Kapselsysteme, die zum zweiten Mal aus der Cyclohexanphase in Wasser überführt wurden.

Die Größe der für diese Arbeit verwendeten Polyharnstoffkapseln in Cyclohexan beträgt 300 ± 100 nm und wurde via dynamische Lichtstreuung (DLS) ermittelt (siehe Tabelle 3). Die

Größenverteilung deutet auf eine Polydispersität hin. Nach der Überführung in Wasser und der Aufreinigung war der dynamische Radius bei einigen Kapseln deutlich größer, wie beispielsweise bei IS-97-2 mit über 1000 nm. Da die Messwerte auf die Bildung von Agglomeraten hindeuteten, wurden die Proben filtriert. Anschließend entsprach der dynamische Radius der Kapseln in etwa der Größenordnung der Kapseln in Cyclohexan.

Das Zetapotential der Kapseln liegt zwischen -20 mV und 47 mV und kann ebenso wie der Feststoffgehalt (gravimetrisch bestimmt in Cyclohexan und Wasser) aus Tabelle 3 entnommen werden. Die Verkapselungseffizienz von Cy5-Oligo lag zwischen 87% und 97%, die der QDots 72%. Um den verbliebenen SDS Gehalt der Partikelsuspension quantitativ zu bestimmen, wurde eine Analyse mit *StainsAll* [108] durchgeführt. Die Suspensionen wiesen Werte zwischen $-0,8 \pm 0,1$ mM und $1,7 \pm 0,1$ mM auf.

In Abbildung 18 sind die REM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-109), ohne Gadolinium (IS-110), mit QDots (IS-111) aus Cyclohexan bzw. Wasser zu sehen. Durch die Trocknungseffekte fallen die Kapseln in sich zusammen.

Tabelle 3: Charakterisierung der Polyharnstoffkapseln, DLS, Zetapotential und Feststoffgehalt. Angegeben ist das verkapselte Material für das TEM bzw. CLSM; * Nach Filtration; ** Qtracker® 800 Cell Labeling Kit; * CdTe.**

Name	Verkapselung		DLS Messwerte ($\varnothing d_h$ in nm)			Zeta-potential (mV)	Feststoffgehalt (%)	
	TEM	CLSM	Cyclohexan	H ₂ O	H ₂ O nach Aufreinigung		Cyclohexan	H ₂ O
IS-75	4,66 mM Gd	Cy5-Oligo	400 ± 100	> 1000	-	-45 ± 3	-	0,53 ± 0,004
IS-75+FBS	4,01 mM Gd	Cy5-Oligo	400 ± 100	> 1000	-	-35 ± 1	-	0,7 ± 0,2
IS-76	-	Cy5-Oligo	600 ± 400	700 ± 700	-	-20 ± 2	-	0,16 ± 0,02
IS-76+FBS	-	Cy5-Oligo	600 ± 400	700 ± 700	-	-47 ± 1	-	0,593 ± 0,07
IS-97	-	SR101	300 ± 100	400 ± 300	> 1000	-20 ± 2	5,91 ± 0,02	0,24 ± 0,01
IS-98	0,45 mM Gd	SR101	300 ± 100	300 ± 200	300 ± 200	-35 ± 0,2	7 ± 1	0,26 ± 0,03
IS-99	QDots**	QDots**	300 ± 100	300 ± 200	300 ± 200	-30 ± 1	6 ± 1	0,29 ± 0,06
IS-97-2	-	SR101	300 ± 100	> 1000	300 ± 100*	-37 ± 4	5,91 ± 0,02	0,18 ± 0,03
IS-98-2	0,45 mM Gd	SR101	300 ± 100	> 1000	400 ± 300*	-41 ± 4	7 ± 1	0,16 ± 0,00
IS-99-2	QDots**	QDots**	300 ± 100	250 ± 100	250 ± 100	-39 ± 1	6 ± 1	0,22 ± 0,05
IS-109	0,1 M Gd	Cy5-Oligo	300 ± 100	500 ± 400	-	-46 ± 2	8,26 ± 0,05	0,39 ± 0,01
IS-110	-	Cy5-Oligo	300 ± 100	> 1000	-	-47 ± 4	5,94 ± 0,08	0,42 ± 0,05
IS-111	QDots***	QDots***	300 ± 100	500 ± 300	-	-42 ± 2	6,7 ± 0,2	0,27 ± 0,05
IS-109-2	0,1 M Gd	Cy5-Oligo	300 ± 100	-	300 ± 100*	-40 ± 2	8,26 ± 0,05	0,45 ± 0,02
IS-110-2	-	Cy5-Oligo	300 ± 100	-	300 ± 100*	-40 ± 1	5,94 ± 0,08	0,40 ± 0,06
IS-111-2	QDots***	QDots***	300 ± 100	-	300 ± 200*	-42,5 ± 0,4	6,7 ± 0,2	0,14 ± 0,01

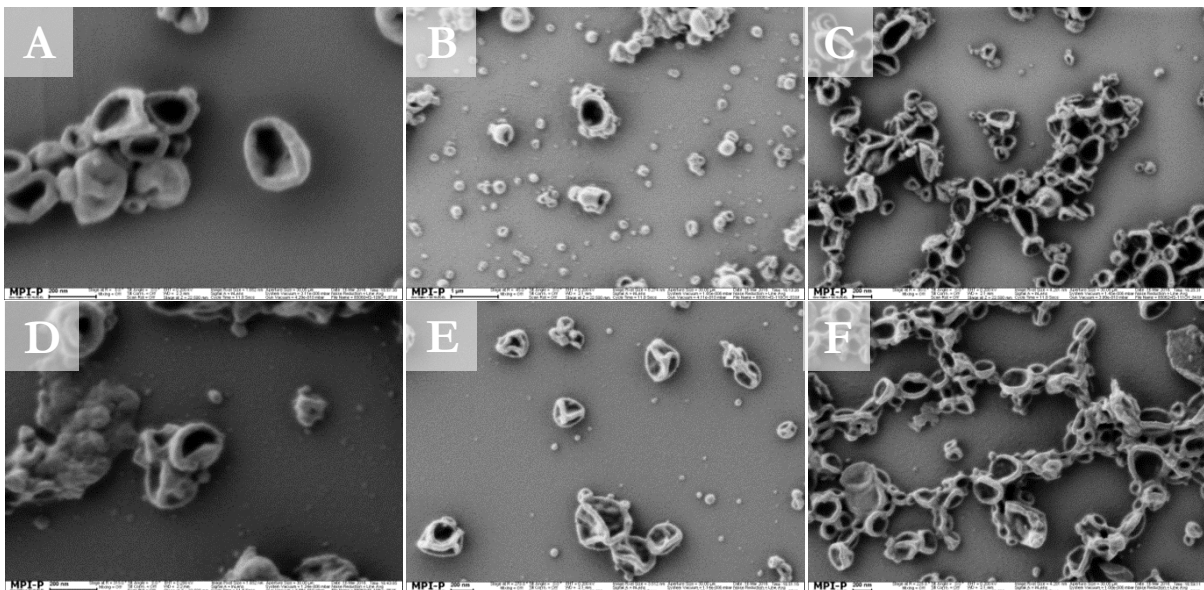


Abbildung 18: REM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (A und D: IS-109), ohne Gadolinium (B und E: IS-110), mit QDots (C und F: IS-111) (Präparation Isabel Schlegel). Zu sehen sind die Kapseln aufgetropft aus Cyclohexan (A – C) und Wasser (D – F).

3.2.1.2 „Drop Casting“

Die Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium (IS-97), mit Gadolinium (IS-98) und mit Qdots (IS-99) wurden aus Cyclohexan zunächst auf TEM-Trägernetzchen, beschichtet mit einem dünnen Kohlefilm, aufgetropft und im TEM untersucht. Die polydispersen Kapseln wiesen hier im eingetrockneten Zustand Größen von ca. 50 nm bis 400 nm auf (siehe Abbildung 19). Die Kapselhülle erschien bei allen Verkapselungstypen in einem dunkleren Kontrast. Im Inneren erkennt man eine helle, gleichmäßige Struktur. Jedoch können keine visuellen Unterschiede zwischen Kapseln mit und ohne Gadolinium festgestellt werden. Bei den Kapseln mit QDots deuten kontrastreiche Punkte auf die Quantenpunkte hin. Da jedoch die Konzentration der verkapselten *Qtracker*[®] sehr gering ausfiel (ca. 0,1 QDot pro Kapsel), wurden in einem weiteren Versuch CdTe-QDots verkapselt, deren Konzentration bedeutend höher war (ca. 10 QDots pro Kapsel).

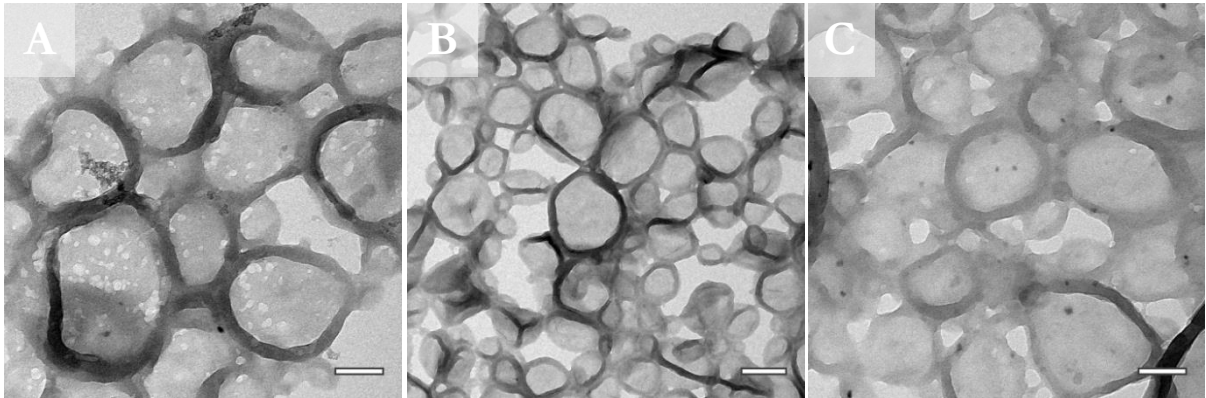


Abbildung 19: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium (A: IS-97), mit Gadolinium (B: IS-98) und mit Qdots (C: IS-99). Abgebildet sind die Kapseln aufgetropft und getrocknet auf einem kohlebefilmten TEM-Netzchen; Maßstab A und C: 100 nm, B: 200 nm.

3.2.1.3 Einbettung in Trehalose

Mithilfe einer Einbettung in Trehalose ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen polymere Nanokapseln nahezu ohne Trocknungsartefakte im TEM betrachten zu können. In RENZ ET AL. zeigen wir, wie sich die Methode für unterschiedliche Nanokapseln eignet und Kapseln kontrastreich im TEM abgebildet werden können [109].

Verglichen mit den kollabierten Kapseln der „Drop Casting“ Methode bleiben die in Trehalose eingebetteten Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-97), ohne Gadolinium (IS-98) und mit CdTe-Qdots (IS-111) somit erhalten und weisen eine rundliche Form auf (siehe Abbildung 20). Auch hier ist die Kapselhülle deutlich kontrastreicher als das Innere der Polyharnstoffkapseln und es können keine optischen Unterschiede zwischen Kapseln mit und ohne Gadobutrol festgestellt werden. Die verkapselten CdTe-QDots sind durch ihren starken Kontrast deutlich sichtbar und zahlreich in den Kapseln vorhanden (siehe Abbildung 20 C).

Werden die Kapseln mit Trehalose und UA auf Netzchen aufgetragen, entsteht ein Negativkontrast (siehe Abbildung 21). Die Struktur der Kapseln wird deutlicher und die Kapselhülle scheint aus zwei abgrenzenden Schichten zu bestehen, wie in Abbildung 21 B zu sehen ist. Die CdTe-QDots konnten nicht detektiert werden, vermutlich war die Kontrastierung der Kapseln mit UA zu stark, sodass die Qdots überlagert wurden (siehe Abbildung 21 C).

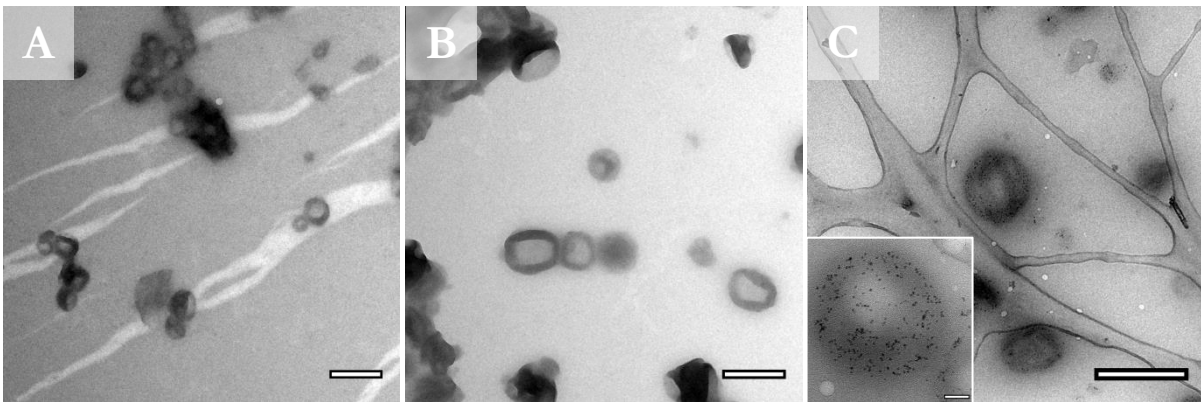


Abbildung 20: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (A: IS-97), ohne Gadolinium (B: IS-98) und mit CdTe-Qdots (C: IS-111); zu sehen sind die Kapseln eingebettet in 1% Trehalose, die CdTe-Qdots sind deutlich erkennbar (C); Maßstab: 400 nm, Inset C: 50 nm.

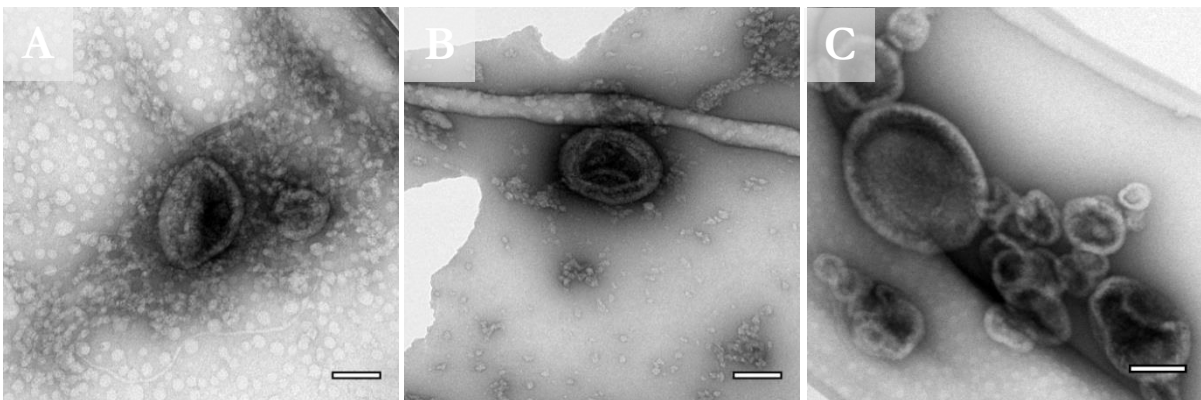


Abbildung 21: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium (A: IS-97-2), mit Gadolinium (B: IS-98-2) und mit Qdots (C: IS-111-2); zu sehen sind die Kapseln eingebettet in 1% Trehalose mit 4% UA auf Lacey-Netzchen, die CdTe-Qdots sind durch die Kontrastierung mit UA nicht erkennbar; Maßstab: 100 nm.

3.2.1.4 EDX und EELS

Durch die elementspezifischen Spektroskopiemethoden EELS und ESI sowie EDX kann das verkapselte Kontrastmittel Gadobutrol als Gd-Signal in Polyharnstoffkapseln nachgewiesen werden. Hierfür wird zunächst die Kapseldispersion auf ein kohlebefilmtes TEM-Trägernetzchen aufgetropft und mittels EDX analysiert. Zu sehen sind im Spektrum deutliche Gadolinium-Signale bei den Kapseln mit Gd (IS-98) (siehe Abbildung 22). Zum Vergleich wurde das Spektrum von Polyharnstoffkapseln ohne verkapseltes Gadobutrol (IS-97) in Abbildung 23 dargestellt.

Die Methode wurde ebenfalls im Zellversuch angewandt, um eindeutig nachweisen zu können, dass es sich bei den abgebildeten Polyharnstoffkapseln innerhalb der Zellen tatsächlich um die Kapseln und nicht um Zellstrukturen oder andere Materialien handelte (Ergebnisse siehe 3.2.2.1).

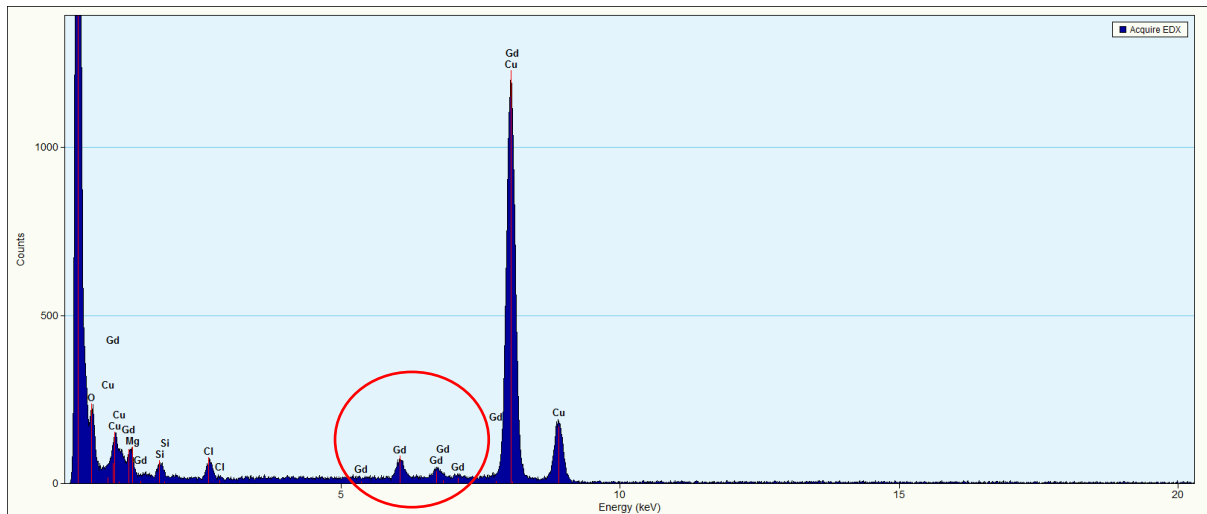


Abbildung 22: Elementspezifische Analyse von Polyharnstoffkapseln IS-98 mittels EDX. Zu sehen sind die Gd-Signale (rot markiert).

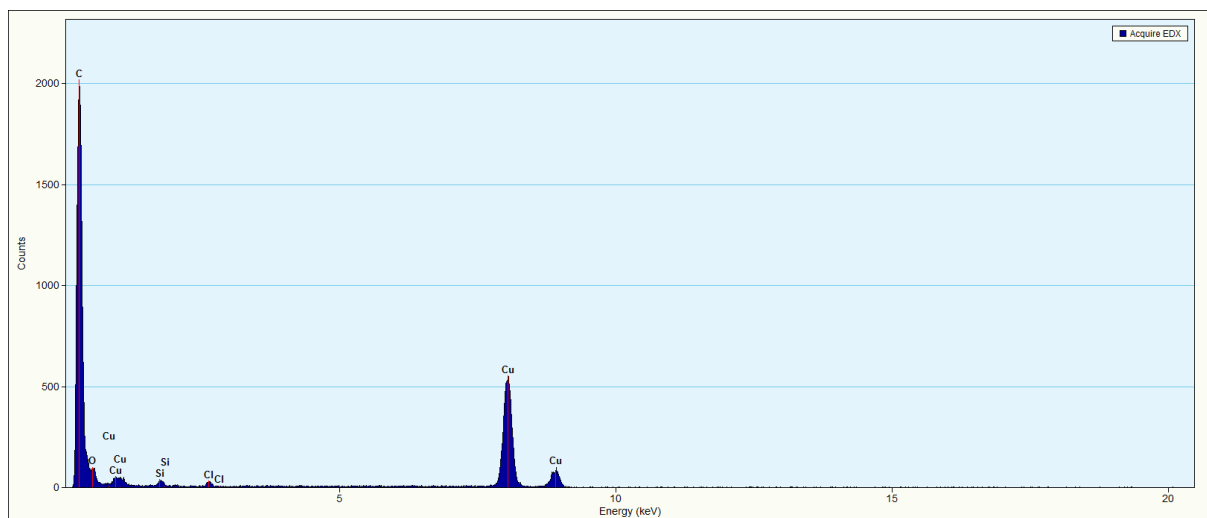


Abbildung 23: Elementspezifische Analyse von Polyharnstoffkapseln IS-97 mittels EDX. Zu sehen sind keine Gd-Signale.

Da sich Polyharnstoffkapseln mit und ohne Gadobutrol visuell nicht voneinander unterscheiden (siehe 3.2.1.2), konnten keine Rückschlüsse gezogen werden, wo sich das verkapselte Gd in den Polyharnstoffkapseln befand. Für den Nachweis wurde die Analyse EELS und ESI angewendet, wobei der Energieverlust des Elements Gd bei ca. 148 eV ausgenutzt wird. Nach der Auswertung der

Energieverlustreihe mit der Software DigitalMicrograph, konnte das Falschfarben-Signal mit der Originalabbildung überlagert werden. Zu sehen ist ein deutliches Signal in der Kapselhülle der Polyharnstoffkapseln IS-109-2 (siehe Abbildung 24, rot eingefärbt). Innerhalb der Kapseln konnte kein Signal detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass sich das verkapselte Gadobutrol lediglich in der Kapselhülle befand.

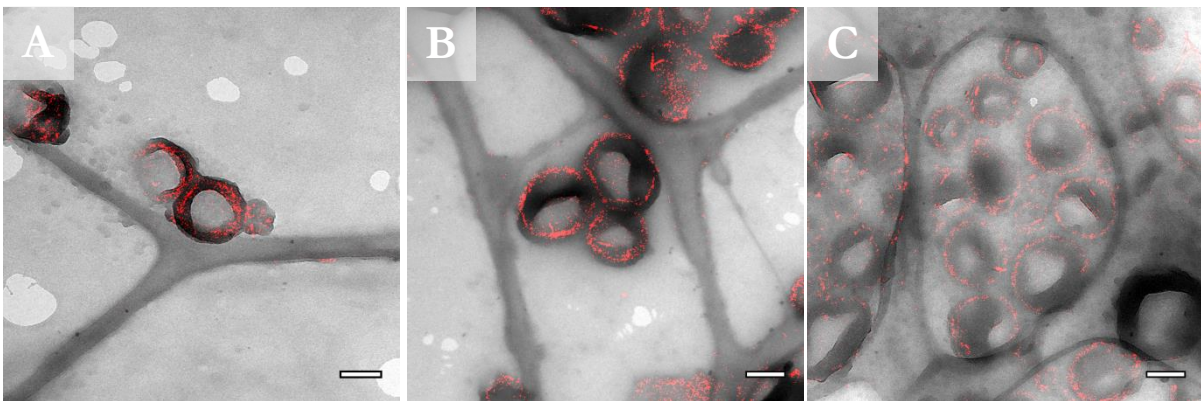


Abbildung 24: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS109-2). Zu sehen ist das Gadoliniumsignal als Falschfarbensignal in rot mittels ESI.

3.2.1.5 Cryo-TEM

Die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie ist die Präparationsmethode in der Elektronenmikroskopie mit der geringsten Artefaktanfälligkeit. Ein Vergleich der Einbettung mit Trehalose und dem Cryo-Transmissionselektronenmikroskop (Cryo-TEM) von Polyharnstoffkapseln mit eingekapselten CdTe-Qdots (IS-111) ist in Abbildung 25 zu sehen. Deutlich sichtbar sind mit dem Cryo-TEM die hellen Strukturierungen im Inneren der Kapseln und die dunklen Kapselschalen der sphärischen Nanoträger (B und C). Die eingekapselten CdTe-Qdots konnten sowohl hier als auch mit Trehalose (A) detektiert werden, wobei die Kapselstruktur, aufgrund des wesentlich geringeren Elektronendichteunterschieds, in Trehalose kaum mehr zu erkennen war.

Die Methode des Cryo-TEMs ist jedoch sehr komplex, und es gestaltet sich als zeitaufwändig, geeignete Konditionen für die Präparation zu finden. Außerdem werden spezielle Geräte benötigt, die nicht in jedem Labor verfügbar sind, wie beispielsweise Cryo-Transfer-Systeme, Cryo-TEM-Halter und *plunging* Systeme, wodurch die Proben halb- bis vollautomatisch durch eintauchen in flüssigen Stickstoff oder Ethan eingefroren werden. Zudem ist die präparierte Matrix aus vitrifiziertem Eis sehr

strahlempfindlich. Für einen routinemäßigen Einsatz ist die Methode daher kaum geeignet. Im Kapitel 3.3.2 werden anhand von Nanohydrogelen alternative Techniken genauer erläutert, die eine einfachere Präparation für Nanokapseln darstellen. Trotz alledem liefert das Cryo-TEM die artefaktfreisten Abbildungen nanopartikulärer Systeme.

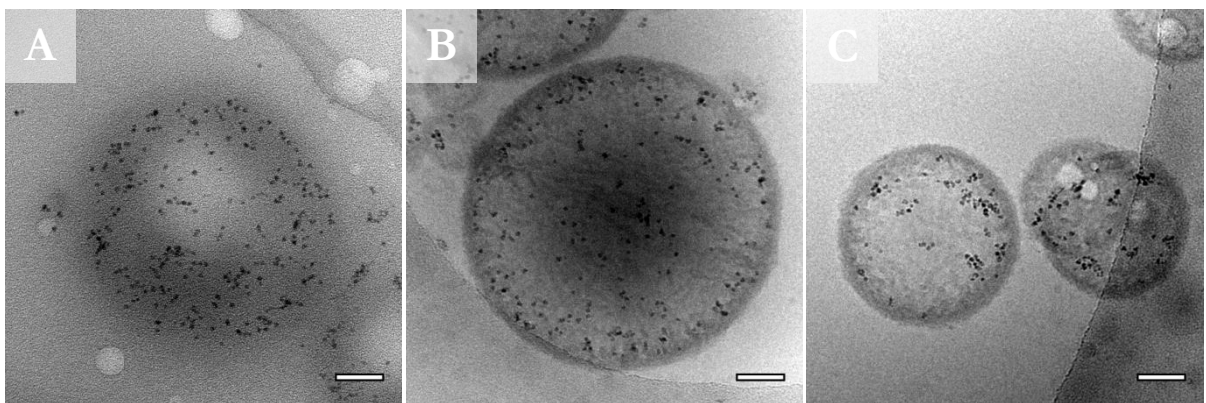


Abbildung 25: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Qdots (IS-111); A: Zu sehen sind die Kapseln mit Qdots eingebettet in 1% Trehalose, B & C: Cryo-TEM-Aufnahmen der Kapseln mit Qdots; Maßstab: 50 nm.

3.2.1.6 Tomographie

Die Tomographie zur Erstellung eines dreidimensionalen Kapselmodells wurde an Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-98-2) durchgeführt. Die Kapseln wurden in Trehalose mit UA eingebettet und zunächst im TEM betrachtet (siehe Abbildung 26 A). Nach Auswahl geeigneter Positionen wurden Tiltserien aufgenommen und die Bilderstapel ausgewertet (*IMOD*, [56]). Eine Abbildung der ausgerichteten und bearbeiteten Bilder-Serie ist in Abbildung 26 B zu sehen. Anschließend konnten 3D-Rekonstruktionen erstellt werden, die einen Einblick in die Kapselstrukturen ergaben (siehe Abbildung 26 C). Es konnte gezeigt werden, dass die Kapseln keine Halbschalen bildeten oder zusammengefallene Strukturen aufwiesen. Die Rekonstruktionen enthielten nicht die vollständigen Informationen, da nicht bis 90° gekippt werden konnte („missing wedge-Problematik“), dennoch waren die Daten ausreichend, um zu zeigen, dass es sich tatsächlich um Kapseln handelt.

Die Tomographie ist eine unterstützende Methode, um z. B. die Morphologie von Nanopartikeln oder -kapseln abzubilden. So können mehr Informationen aus der dreidimensionalen Abbildung gewonnen werden, als aus einem zweidimensionalen Bild. Zudem ist die Tomographie einfach

anzuwenden und wenig zeitaufwendig. Mit der Tomographie und der Einbettung in Trehalose konnte hier erstmals die 3D-Struktur von Polyharnstoffkapseln ohne Trocknungsartefakte gezeigt werden.

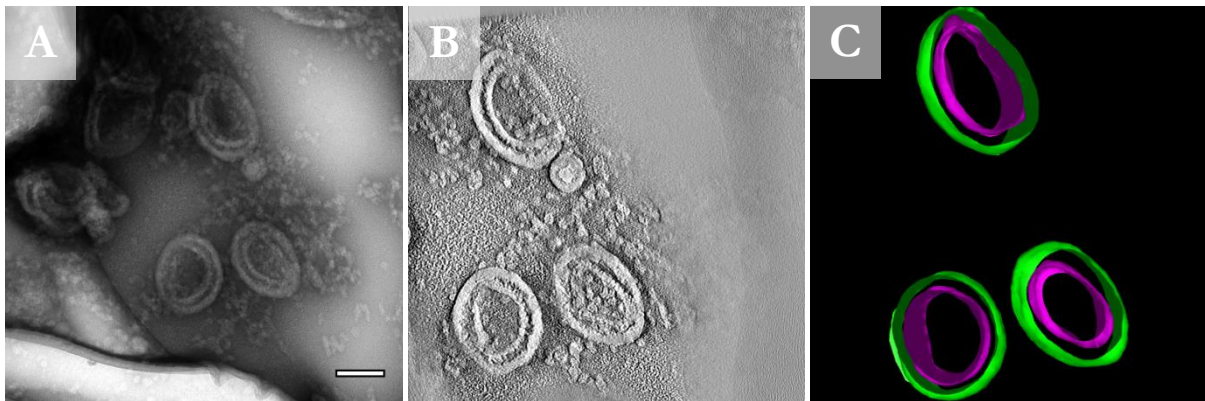


Abbildung 26: Tomogramm aus der Tiltserie von Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-98-2); A: Zu sehen sind die Kapseln eingebettet in 1% Trehalose mit 4% UA im TEM, B: Optischer Schnitt aus der Rekonstruktion der Tiltserie, C: 3D-Modell des in A gezeigten Bildes; Maßstab: 100 nm.

3.2.2 Biologie: Wechselwirkung mit Zellen

Für die Untersuchung der Polyharnstoffkapseln in Zellversuchen wurden diese aus Cyclohexan in Wasser überführt und auf Agglomerate überprüft (siehe 3.2.1.1). Um die Aufnahmefähigkeit der Kapseln zu beurteilen, wurden diese mit fetalem Kälberserum (engl. „fetal bovine serum“, FBS) vorinkubiert (IS-75+FBS und IS-76+FBS) und mit Kapseln ohne Vorinkubation verglichen (IS-75 und IS-76). Das FBS wurde eingesetzt, um zu sehen, ob die Proteine des Serums einen Einfluss auf die Aufnahmefähigkeit haben und um mögliche Aggregatbildungen der Kapseln zu verhindern. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Agglomeratbildung (DLS-Messdaten siehe 3.2.1.1) festgestellt werden, sodass bei künftigen Versuchen kein FBS mehr benutzt wurde. Auch konnten keine visuellen Unterschiede bei der Aufnahmefähigkeit in die Zelle (CLSM) beobachtet werden.

3.2.2.1 Korrelative Methode: CLSM und TEM

MSCs wurden mit Polyharnstoffkapseln inkubiert (150 µg/ml) und die Aufnahme in die Zellen am CLSM überprüft. Die Zellen fluoreszierten durch den Membranmarker CellMask™ Green und sind in Abbildung 27 in grün dargestellt, die Kapseln enthielten Cy5-Oligo, was als rotes Signal zu sehen ist.

Es fand eine Zellaufnahme der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-75+FBS und IS-75) statt. Die Inkubationszeiten der Zellen im Brutschrank betragen dabei 40 min, 90 min und 120 min. Sowohl die Kapseln IS-75+FBS (siehe Abbildung 27 A & B) als auch IS-75 ohne FBS (siehe Abbildung 27 C) konnten innerhalb der Zellen detektiert werden. Hierbei gab es visuell keine feststellbaren Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte keine Aufnahme der Kapseln ohne Gadolinium (IS-76), egal ob IS-76+FBS oder IS-76 ohne FBS, beobachtet werden (siehe Abbildung 28). Weder nach 30 min noch nach 90 min Inkubationszeit konnte eine Aufnahme beobachtet werden. Vermutlich aggregieren die Kapseln ohne Gadolinium zu stark, sodass diese für eine Zellaufnahme zu groß sind. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine veränderte Oberfläche verglichen mit Kapseln mit Gd, jedoch gibt es keine Unterschiede in den Messdaten wie z. B. im Zetapotential (siehe 3.2.1.1). Die Agglomeratbildungen konnten visuell im CLSM außerhalb der Zellen als orange-rotes Signal erkannt werden (siehe Abbildung 28).

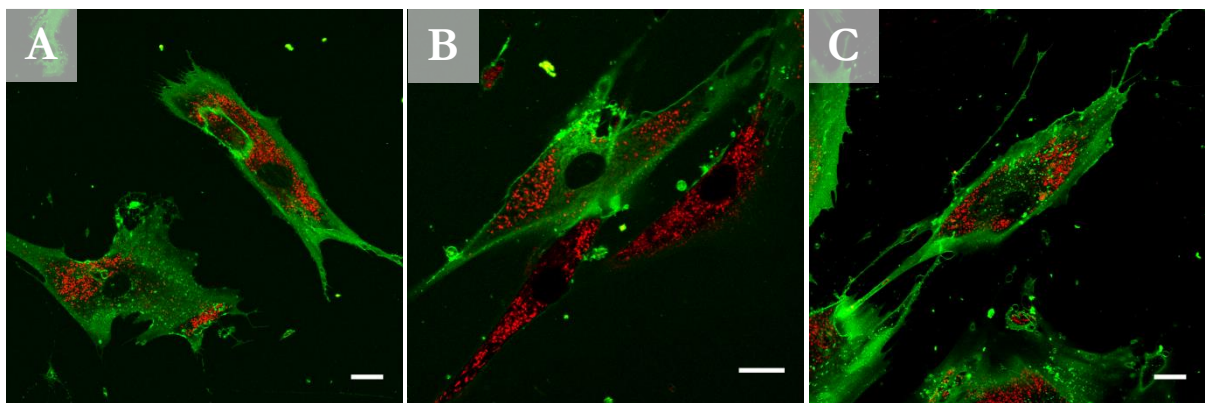


Abbildung 27: CLSM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-75+FBS und IS-75) im Zellversuch. Zu sehen ist das Signal der Kapseln innerhalb der MSCs in rot (Cy5-Oligo), A & B: Die Kapseln wurden vorher mit FBS inkubiert, die Inkubationszeiten betragen 40 min (A) und 90 min (B), C: die Kapseln wurden vorher nicht mit FBS inkubiert, die Inkubationszeit betrug 120 min, es konnte kein Unterschied in der Aufnahmefähigkeit der Kapseln festgestellt werden, Zellfärbung mit CellMask™ Green; Maßstab: 20 μm .

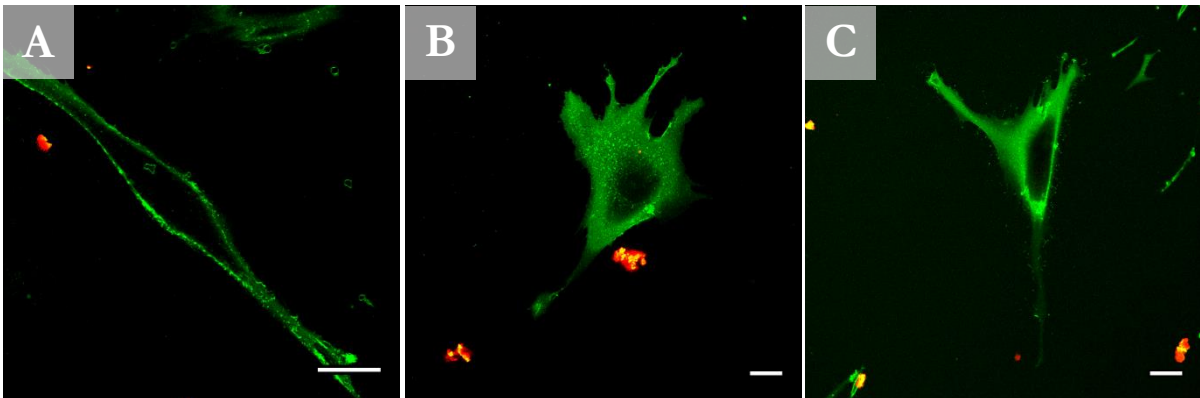


Abbildung 28: CLSM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium (IS-76+FBS und IS-76) im Zellversuch. Abgebildet ist das Signal der Kapseln außerhalb der MSCs in rot (Cy5-Oligo), A: Die Kapseln wurden vorher mit FBS inkubiert, die Inkubationszeit betrug 30 min (A), B und C: die Kapseln wurden vorher nicht mit FBS inkubiert, die Inkubationszeit betrug jeweils 90 min, es konnte keine Aufnahme der Kapseln festgestellt werden, die Kapseln bildeten Agglomerate außerhalb der Zellen (B), Zellfärbung mit CellMask™ Green; Maßstab: 20 μ m.

Um die Kapseln transfizierter (*Clathrin-15*) MSCs zu testen, wurden die Zellen für 3 h mit Polyharnstoffkapseln (150 μ g/mL) ohne Gadolinium (IS-97-2), mit Gadolinium (IS-98-2) und mit Qdots (IS-99-2) inkubiert und anschließend im CLSM betrachtet (siehe Abbildung 29). Bei allen Proben konnte die Aufnahme der Kapseln beobachtet werden, wobei die Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellen mit den gadoliniumhaltigen Kapseln IS-98-2 am stärksten sind. Bei den Proben IS-97-2 ohne Gd konnten kaum Fluoreszenzsignale der Kapseln in Zellen detektiert werden, vermutlich nahmen hier nicht alle Zellen gleichmäßig Kapseln auf. Eine mögliche Erklärung ist auch hier eine unterschiedliche Aggregatbildung, sodass Kapseln ohne Gd (IS-97-2) größere Aggregate bilden, die von den Zellen in geringerem Maße aufgenommen werden. Die Messdaten wie Zetapotential (siehe 3.2.1.1) geben auch für diese Charge an Polyharnstoffkapseln keine Hinweise auf Veränderungen der Oberflächen.

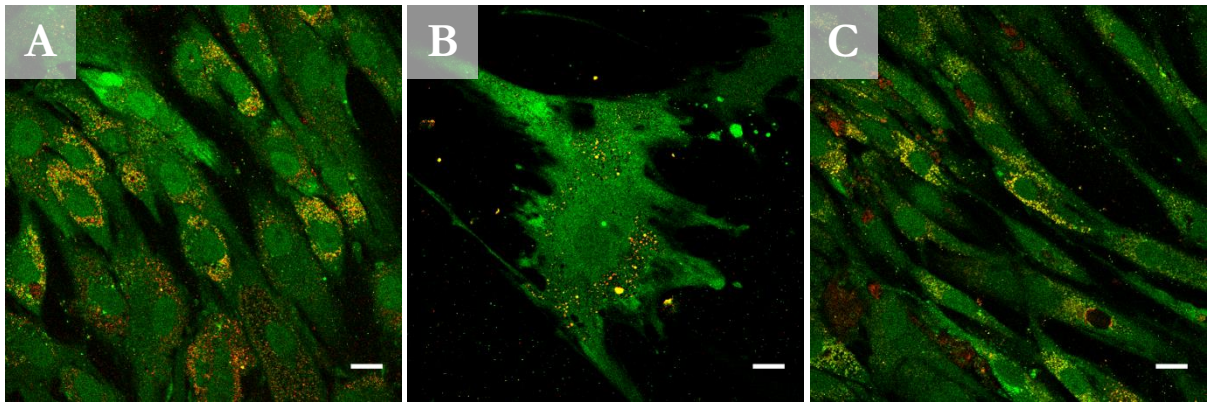


Abbildung 29: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit Clathrin-15 (grün) inkubiert mit Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium (A: IS-97-2), mit Gadolinium (B: IS-98-2) und mit Qdots (C: IS-99-2). Abgebildet ist das Signal der Kapseln innerhalb der Zellen in rot (SR101, QDots), Die Inkubationszeit betrug jeweils 3 h, Zellfärbung mit SNAP-Cell® Oregon Green®; Maßstab: 20 µm.

Die Aufnahme der Kapseln ohne Gd (IS-97-2), mit Gd (IS98-2) und mit QDots (IS99-2) wurde auch mit transfizierten DCs (*Tubuli-C-18*) getestet. Hierfür wurden die Kapseln (150 µg/mL) über Nacht inkubiert und eine Aufnahme anhand des Fluoreszenzsignals von SR101 (rot) sollte nachgewiesen werden. Die Signale von SR101 waren jedoch zu schwach für Aufnahmen und damit nicht optimal für die Messungen, weswegen SR101 für die nachfolgend synthetisierten Kapseln nicht mehr verwendet wurde. Stattdessen wurde auf Cy5-Oligo zurückgegriffen und der Versuch wiederholt.

Die Kapseln mit Gd (IS-109-2), ohne Gd (IS-110-2) und mit QDots (IS-111-2) enthielten demnach Cy5-Oligo als verkapselten Marker und wurden über Nacht zu transfizierten DCs (*Tubuli-C-18*) gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse am CLSM. Die Kapseln wurden von den DCs aufgenommen und konnten innerhalb der DCs detektiert werden (siehe Abbildung 30). Die Signale fielen verhältnismäßig stark aus und deuten darauf hin, dass sich mehrere Kapseln in größeren Vesikeln in den Zellen befanden.

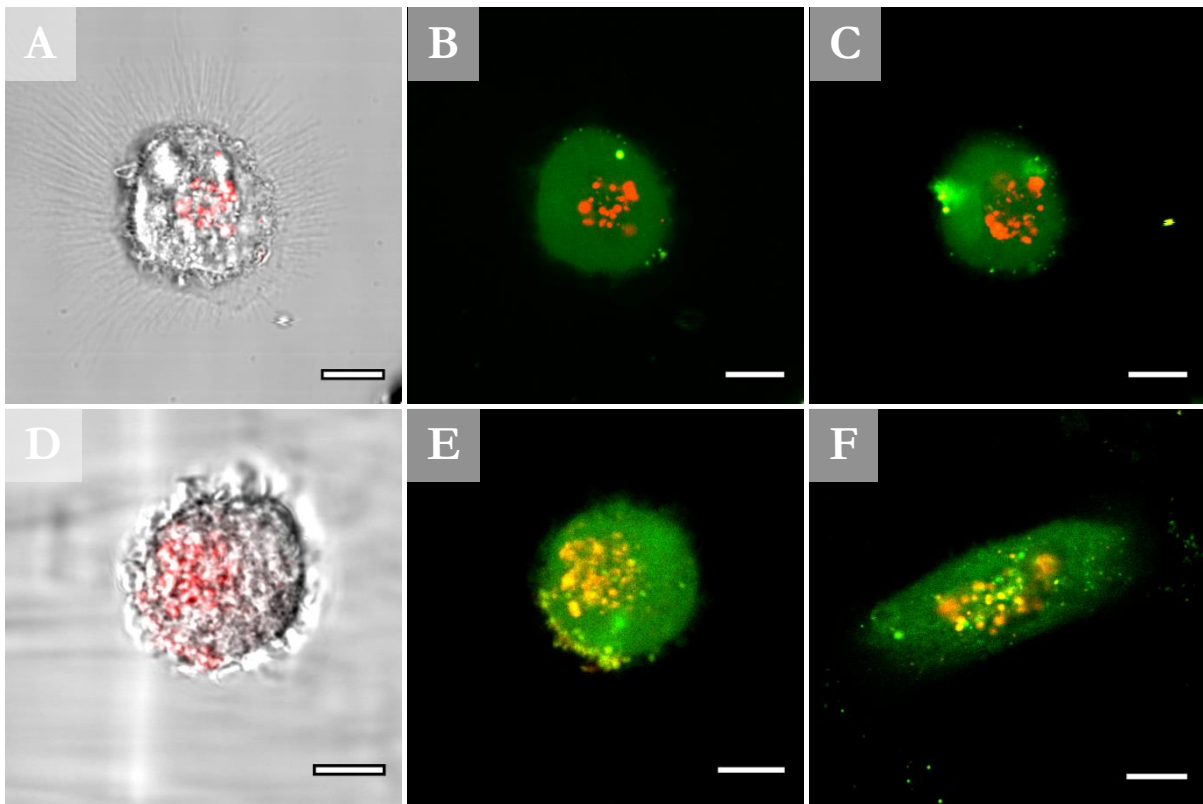


Abbildung 30: CLSM-Aufnahmen transfizierter DCs mit Tubuli-C-18 (grün) inkubiert über Nacht mit Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (A – C: IS-109-2), mit QDots (D und E: IS-111-2) und ohne Gd (F: IS-110-2). Zu sehen ist das Signal der Kapseln innerhalb von DCs in rot oder gelb (Überlagerungssignal; Cy5-Oligo, QDots), A und D: Zelle im Hellfeld mit Fluoreszenzsignal der Polyharnstoffkapseln, B und E: die selbe Zelle mit Transfektionssignal, C: andere Z-Ebene derselben Zelle wie in A und B, F: Zelle mit Transfektionssignal, Zellfärbung mit SNAP-Cell® Oregon Green®; Maßstab: A – C und F: 10 μm , D und E: 7 μm .

Um Details über die Morphologie der Kapseln innerhalb von Zellen zu erhalten, wurde der Versuch für die Analyse im TEM mit DCs wiederholt und die Präparation entsprechend für das Elektronenmikroskop mittels HPF durchgeführt. Die Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2), ohne Gd (IS-110-2) und mit QDots (IS-111-2) konnten auch hier innerhalb der Zellen detektiert werden. In Abbildung 31 und Abbildung 32 sind die Kapseln mit Gd und mit QDots innerhalb der Zellen zu sehen. Dies stellt den ersten Nachweis von polymeren Nanokapseln in Zellen mit dem TEM dar. Bisher wurden lediglich Vollpartikel in Zellen mittels TEM gezeigt [110]. Die Kapseln wurden, wie durch die Aufnahmen am CLSM bereits vermutet, in größeren Zusammenschlüssen in den Zellen beobachtet. Die Übersicht einer dendritischen Zelle im TEM (Abbildung 32) zeigt das Größenverhältnis des Kapsel-Einschlusses gegenüber der Zelle. Es handelt sich dabei um die Polyharnstoffkapseln IS-111-2 mit verkapselten CdTe-QDots in einem einzigen großen Vesikel. Das Vesikel weist eine längliche Form, mit einer Breite von rund 2 μm und einer Länge von ca. 6 μm , auf. Bei höheren Auflösungen kann

man die Struktur der Kapseln erkennen, wobei einige Kapseln eng beieinander liegen und sich dadurch deformieren (Abbildung 32 C und F), wohingegen einzelne Kapseln ihre runde Form beibehalten (Abbildung 32 D). Aufgrund der Vielzahl von kontrastreichen Strukturen in den Zellen und der runden Form von Vesikeln, erwies es sich als schwierig, die kontrastarmen Nanokapseln in den Zellen abbildend zu identifizieren. Ob es einzelne Polyharnstoffkapseln in den Zellen gab, konnte nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Hierfür bedarf es anderer Nachweistechniken, wie beispielsweise EELS mit ESI oder, wie nachfolgend gezeigt, EDX (Abbildung 33), um die QDots oder das Gadolinium nachweisen zu können und so einen eindeutigen Nachweis der Kapseln erbringen zu können. Die QDots konnten in den TEM-Aufnahmen kaum beobachtet werden, da die Zellen und das eingesetzte OsO_4 sowie UA starke Kontraste verursachten, die möglicherweise die QDots überlagerten, wie in Abbildung 32 zu sehen ist.

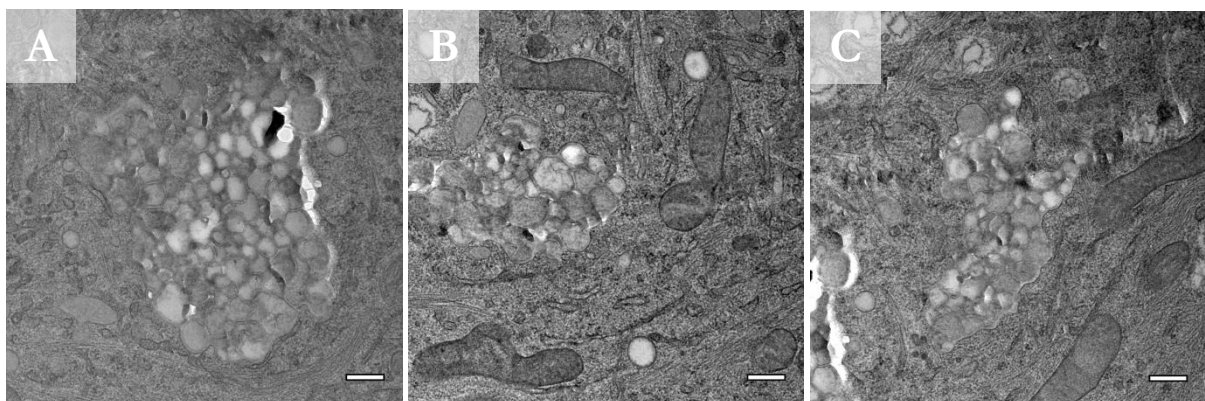


Abbildung 31: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-109-2) im Zellversuch; zu sehen sind Cluster der Kapseln innerhalb dendritischer Zellen, Maßstab 200 nm.

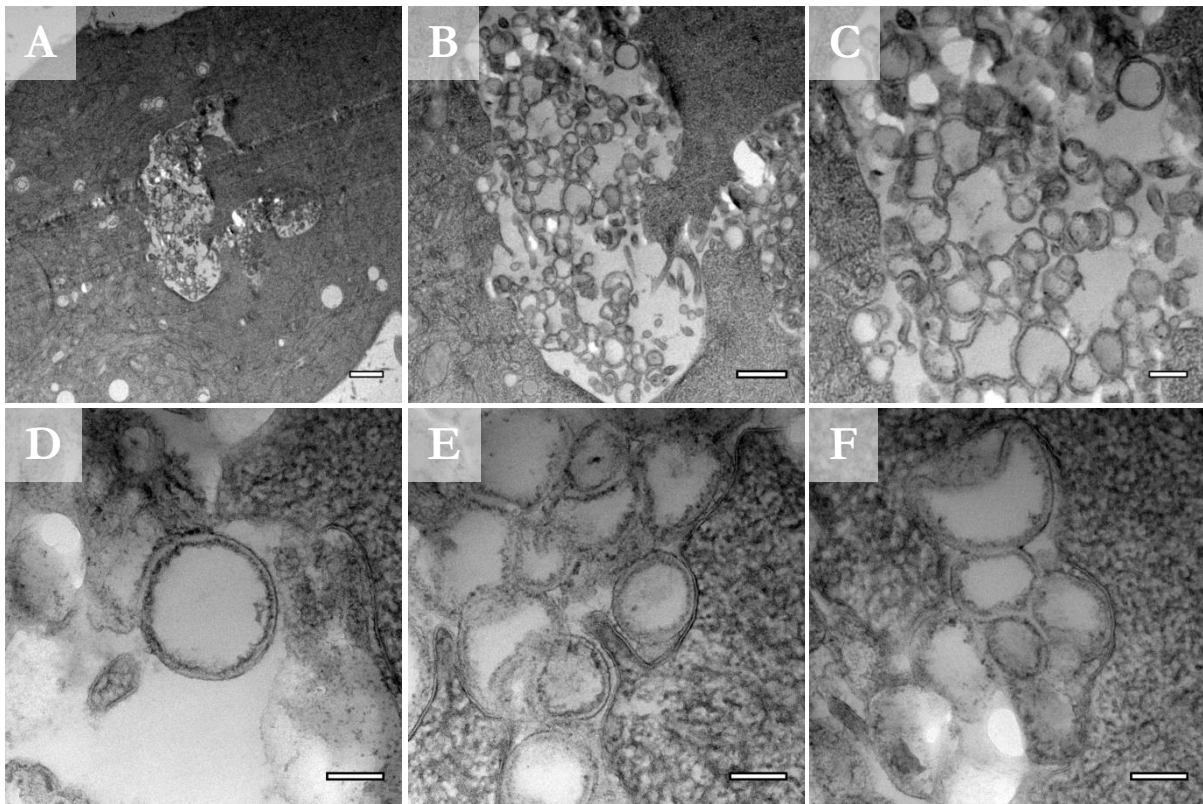


Abbildung 32: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit QDots (IS-111-2) im Zellversuch; zu sehen sind Cluster der Kapseln innerhalb dendritischer Zellen, die Qdots sind nicht erkennbar; Maßstab A: 1 µm, B: 500 nm, C: 200 nm, D – F: 100 nm.

Um das Gadolinium der Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2) innerhalb von dendritischen Zellen eindeutig nachweisen zu können, wurden elementspezifische Analysen mittels EDX durchgeführt. An einem großen Cluster der Kapseln war es möglich, ein spezifisches Signal von Gadolinium zu erhalten (siehe Abbildung 33). Entlang der orangenen Linie wurde das Spektrum aufgenommen und beim Auftreffen des Strahls auf die gadoliniumhaltige Kapselschale, zeigt das Spektrum die Signale des Gadoliniums. Das Kreuz markiert die Stelle des jeweils darunter abgebildeten Spektrums. Zu erkennen ist zudem, dass nicht jede Stelle der Kapseln Gadolinium enthält. Dies bestätigt die Detektion von Gadolinium in der Kapselschale, die mit EELS und ESI beschrieben wurden (siehe 3.2.1.4). Ebenfalls eine gute Möglichkeit, die Kapseln zu erkennen, bietet der Negativkontrast mit dem Rastertransmissionselektronenmikroskop-Modus (engl. „scanning transmission electron microscope“, STEM) (siehe Abbildung 34). Vergleicht man die normalen TEM-Aufnahmen der Zellen mit Kapseln mit dem Negativkontrast, können die Polyharnstoffkapseln IS-109-2 deutlich von den umliegenden Zellstrukturen unterschieden werden.

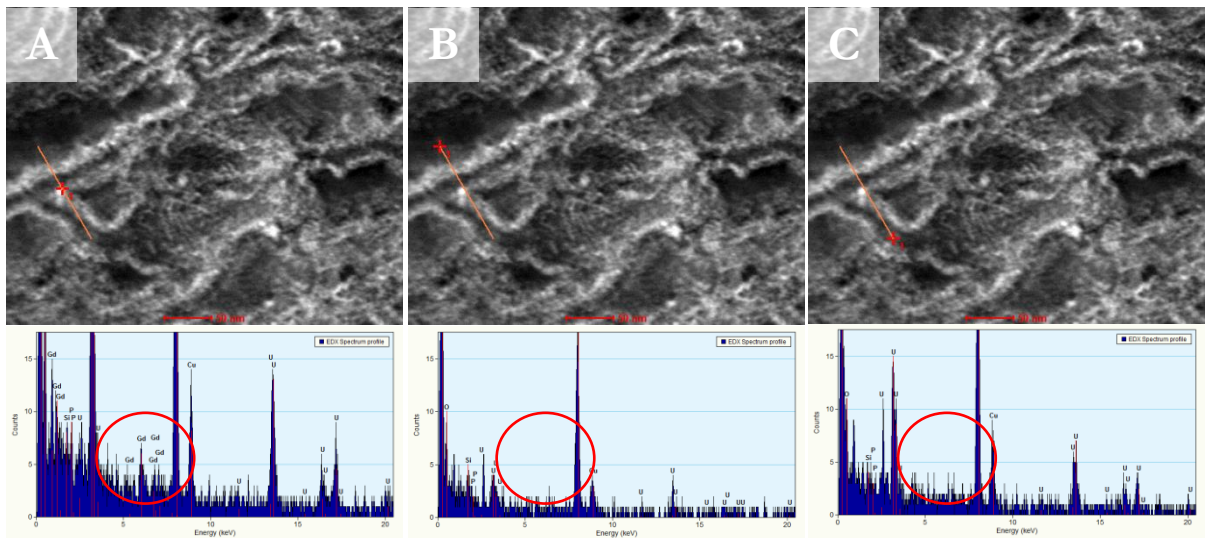


Abbildung 33: STEM-Aufnahmen von Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2) im Zellversuch. Aufgrund der Detektionsmethode mit einem Dunkelfelddetektor erscheinen die Aufnahmen im Negativkontrast (STEM). Entlang der Linie (orange) wurden EDX-Spektren aufgenommen und die relative Konzentration (in counts) gegen die Position aufgetragen, das EDX-Spektrum (unten) zeigt das EDX-Spektrum an der Position des Kreuzes (rot), die Stelle im Spektrum, wo das Gd-Signal erwartet wird, ist rot markiert; Maßstab: 50 nm.

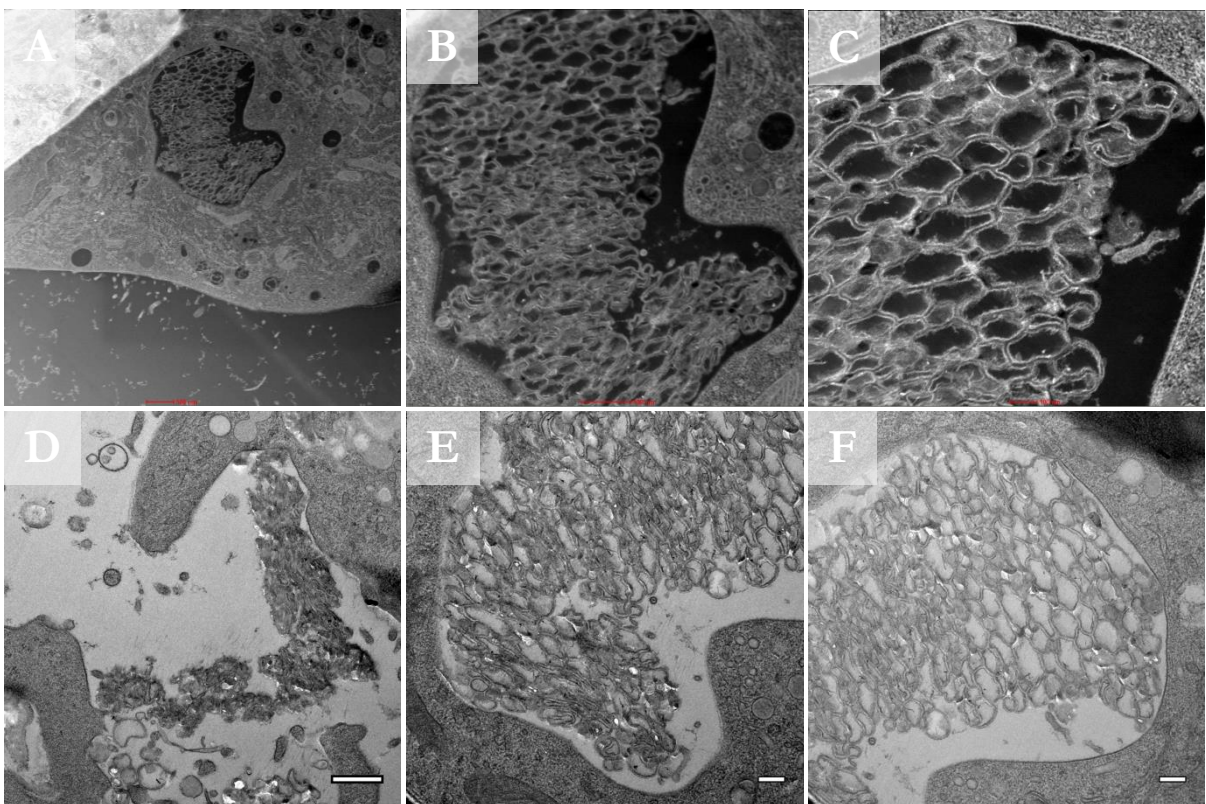


Abbildung 34: STEM- und TEM-Aufnahmen von Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2) im Zellversuch. Zu sehen sind die Partikel im Negativkontrast (A – C: STEM) und im normalen Kontrast (D – F: TEM); Maßstab A, B und D: 500 nm, C: 100 nm, E und F: 200 nm.

3.2.2.2 Durchflusszytometrie und Zytotoxizität mittels FACS®

Mittels FACS®-Messungen von MSCs konnte gezeigt werden, dass Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-98-2) die höchste Aufnahme in MSCs aufwiesen, verglichen mit den Kapseln ohne verkapselten Marker (IS-97-2) und mit verkapselten QDots (IS-99-2) (siehe Abbildung 35). Dies entspricht den Beobachtungen der CLSM-Analysen (siehe 3.2.2.1).

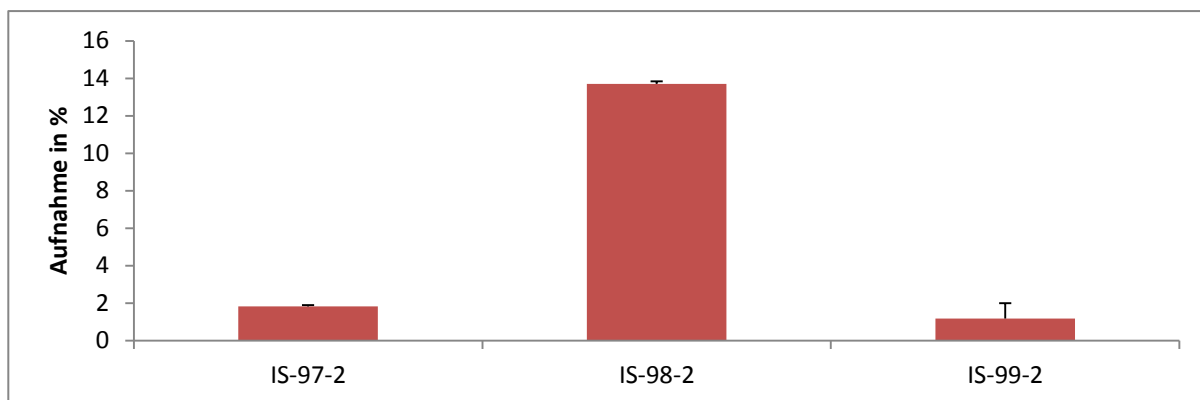


Abbildung 35: FACS®-Messung der Polyharnstoffkapseln ohne Gd (IS-97-2), mit Gd (IS-98-2) und mit QDots (IS-99-2), angegeben ist die Aufnahme in % der MSCs (rot).

Die Bestimmung der Zytotoxizität von Polyharnstoffkapseln bei MSCs ergab bei allen Polyharnstoffkapseln eine Zellviabilität von über 97% (siehe Abbildung 36). Bei den DCs ergab die Analyse der lebenden Zellen bei den Kapseln mit Gd (IS-110-2) den niedrigsten Wert mit 88%, 89% für die Kapseln mit QDots (IS-111-2) und 93% lebende Zellen für die Kapseln mit Gd (IS-109-2). Demnach haben die eingesetzten Konzentrationen an Kapselmateriale keinen bzw. kaum einen Einfluss auf die Zellen. Besonders bei den Polyharnstoffkapseln mit verkapselten CdTe-QDots war es wichtig zu wissen, ob eine Toxizität der Nanomaterialien vorhanden ist, da die QDots selbst als toxisch gelten. Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Verkapselung der QDots diese von den zellulären Prozessen abschirmt und die Zellen in ihrer Viabilität nicht beeinträchtigen können.

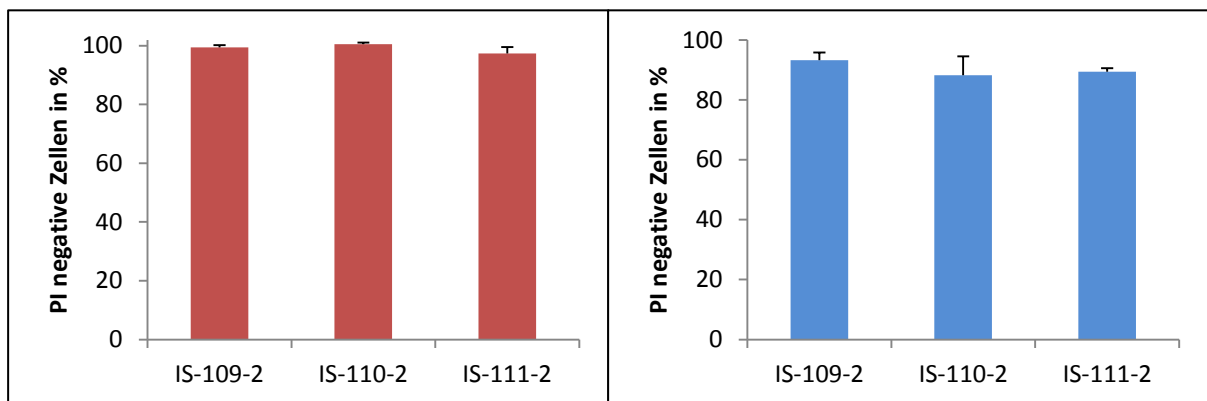


Abbildung 36: Zytotoxizitätstest der Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2), ohne Gd (IS-110-2) und mit QDots (IS-111-2), angegeben sind die lebenden Zellen (PI negativ) in % der MSCs (rot, links) und der DCs (rechts, blau).

In dieser Arbeit ist es gelungen, gut charakterisierte und nicht-toxische Polyharnstoffkapseln als Modelkapseln visuell und direkt nachzuweisen. Eingebettet in Trehalose ist die Struktur von Kapseln ohne Veränderungen durch Trocknungsartefakte zu erkennen und die 3D-Struktur zeigt gleichzeitig die Form der Kapseln. Im Zellversuch können Kapseln zunächst am Fluoreszenzmikroskop innerhalb der Zellen detektiert werden. Hier können jedoch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, ob es sich nur um den Fluoreszenzfarbstoff handelt, der in den Zellen detektiert werden kann oder ob tatsächlich die Kapseln in den Zellen vorliegen. Zudem kann in den Zellen lediglich ein Signal detektiert werden, ob es sich dabei um einzelne Kapseln oder Ansammlungen handelt, kann hier nicht untersucht werden. Mithilfe des TEMs und dem hier eingekapselten Marker Gd ist es jedoch möglich, Kapseln spezifisch mit EDX innerhalb der Zellen nachzuweisen. Außerdem kann gezeigt werden, dass sich zahlreiche Kapseln in großen Vesikeln befinden, da diese im TEM visuell einzeln erkannt werden können. Zusätzlich konnte die Lage des verkapselten Gds mit EELS und ESI in der Kapselschale nachgewiesen werden und verkapselte QDots können nicht nur als Fluoreszenzmarker sondern auch als elektronendichter Marker für das TEM genutzt werden.

Die hier gezeigten Methoden bieten ein breites Spektrum an Nachweismöglichkeiten und geben Aufschluss über die Morphologie von Nanokapseln in biologischen Anwendungen.

3.3 Methoden zum Nachweis funktionalisierter Nanoträger-Systeme

Die in dieser Arbeit etablierten Nachweismethoden für polymere Nanoträgersysteme können für verschiedene Fragestellungen angewendet werden. In diesem Kapitel wird die Anwendung der Methoden an drei unterschiedlich funktionalisierten Nanoträger-Systemen für medizinische Anwendungen vorgestellt.

3.3.1 Antikörperfunktionalisierte magnetische Polystyrolpartikel (DEMA-Partikel)

Bei dem vorangegangenen Kapitel lag der Fokus auf dem spezifischen Nachweis der Nanokapseln im TEM mithilfe von verkapselten Markern ohne dabei die Aufnahmefähigkeit der Kapseln bestimmter Zelllinien zu berücksichtigen. Um eine spezifische Aufnahme von Nanoträger-Systemen für verschiedene Zellen zu erreichen, können chemische Modifikationen der Partikeloberflächen genutzt werden. Dafür werden z. B. Antikörper oder Liganden chemisch an die Oberfläche gekoppelt, die wiederum spezifisch an die Zelloberfläche binden und die Aufnahme bewirken.

Um eine spezifische Aufnahme in Zellen zu erreichen, werden beispielsweise magnetische Polystyrolpartikel mit *Anti-CD63*-Antikörpern funktionalisiert. Das Protein CD63 kommt innerhalb von Zellen und an der äußeren Membran vor und zählt zu den Tetraspaninen. In Kooperation mit MANUEL TONIGOLD galt es, einen visuellen Nachweis von gekoppelten sowie adsorbierten Antikörpern an die Oberfläche von den Polystyrolpartikeln DEMA mittels TEM darzustellen und die Partikel mithilfe des verkapselten Magnetits in den Zellen zu detektieren. Damit sollten die vorangegangenen Beobachtungen mit dem Fluoreszenzmikroskop der Partikelaufnahme in DCs bestätigt und Details über die Morphologie der Partikel innerhalb der Zellen erhalten werden. Zusätzlich sollten elementspezifische Analysen für den Antikörpernachweis durchgeführt werden, um die visuellen Beobachtungen zu festigen. In TONIGOLD ET AL. wurden die hier gezeigten Nachweismethoden mittels TEM für die DEMA-Partikel veröffentlicht [111].

Abbildung 37 zeigt schematisch die Immobilisierung der Antikörper auf den magnetischen Partikeln. Die chemische Anbindung der Antikörper wurde mittels EDC-Kupplungsreaktion durchgeführt und die physikalische Immobilisierung durch eine einfache Adsorption der Antikörper an die Nanopartikeloberfläche erreicht. Laut vorangegangener Arbeiten war die Oberflächenladung aller

verwendeten Partikel mit Antikörpern gleich und der Einsatz der Partikel im Zellversuch mit Dendritischen Zellen wies eine Viabilität von über 90% auf. Dies deutet darauf hin, dass die Partikel nicht toxisch wirken [111].

Serumproteine können einen großen Einfluss auf Funktionalisierungen von Nanopartikeln haben, indem sie diese beispielsweise überlagern, was zu einem Verlust der Spezifität führen kann [112]. Ebenso können adsorbierte Proteine in proteinreicher Umgebung verschoben und ersetzt werden [113, 114].

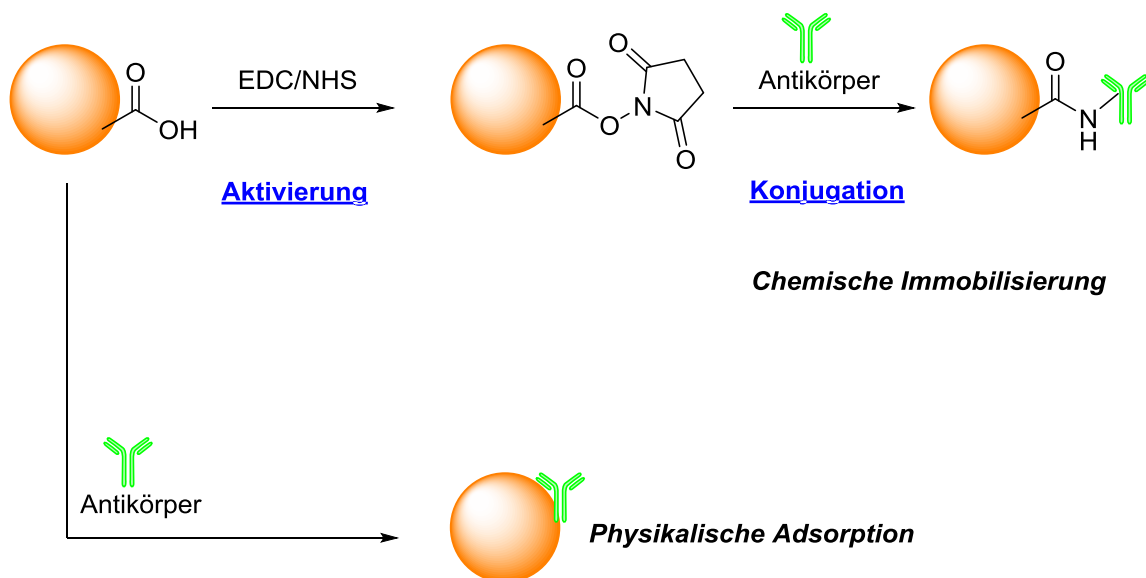


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Methodik der Immobilisierung von Antikörpern auf der Oberfläche von DEMA-Partikeln; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra; modifiziert nach [111].

Um zu überprüfen, ob sich Serumproteine auf die antikörpermodifizierten DEMA-Partikel auswirkten, wurden die Nanopartikel ($0,4 \mu\text{g}$) mit verschiedenen Humanserum Konzentrationen für 2 h bei 37°C inkubiert (0%, 10% und 100%) und anschließend die Bindung nach Zugabe eines sekundären Anti-Maus Gold-Antikörper-Konjugats (12 nm Colloidal Gold) mittels „Drop Casting“ im TEM überprüft. Die Anbindung des sekundären Gold-Antikörpers ist in Abbildung 38 schematisch dargestellt. Die sekundären Antikörper wiesen bei allen eingesetzten Serumkonzentrationen eine starke Bindung an die antikörper-funktionalisierten Nanopartikel auf, wie in Abbildung 40 und Abbildung 41 zu erkennen ist. Dagegen fand keine Bindung der Gold-Antikörper-Konjugate an nicht-funktionalisierte Partikel statt (siehe Abbildung 39). Eine schematische Darstellung der Anbindung des sekundären Gold-Antikörpers ist in Abbildung 38 gezeigt.

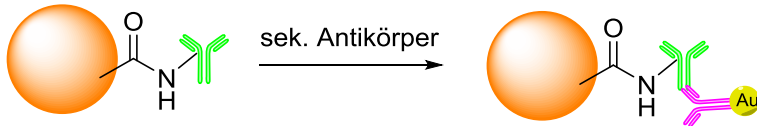


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Anbindung des sekundären Gold-Antikörpers (12 nm colloidal Gold) an den primären Antikörper von funktionalisierten DEMA-Partikeln; erstellt mit ChemBioDraw® Ultra.

Weiterhin wurde eine elementspezifische Analyse (EDX) durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den visualisierten Gold-Antikörpern tatsächlich um Gold handelt und nicht um das verkapselte Eisenoxid oder andere Elemente. Hierfür wurden Aufnahmen mit dem STEM durchgeführt (siehe Abbildung 42) und entlang einer Linie (orange) durch vermeintliche Gold Partikel gemessen. Zu sehen sind zudem die Gold Counts an jeder Position der roten Linie, die aufgrund der grünen Markierung im Spektrum berechnet worden sind. Die elementspezifische Analyse zeigt, dass es sich bei den kontrastreichen Teilchen tatsächlich um die sekundären Gold-Antikörper handelt, die spezifisch an die primären Antikörper der funktionalisierten DEMA-Partikel gebunden waren. Mit dieser Methode konnte die Bindung bildlich dargestellt werden.

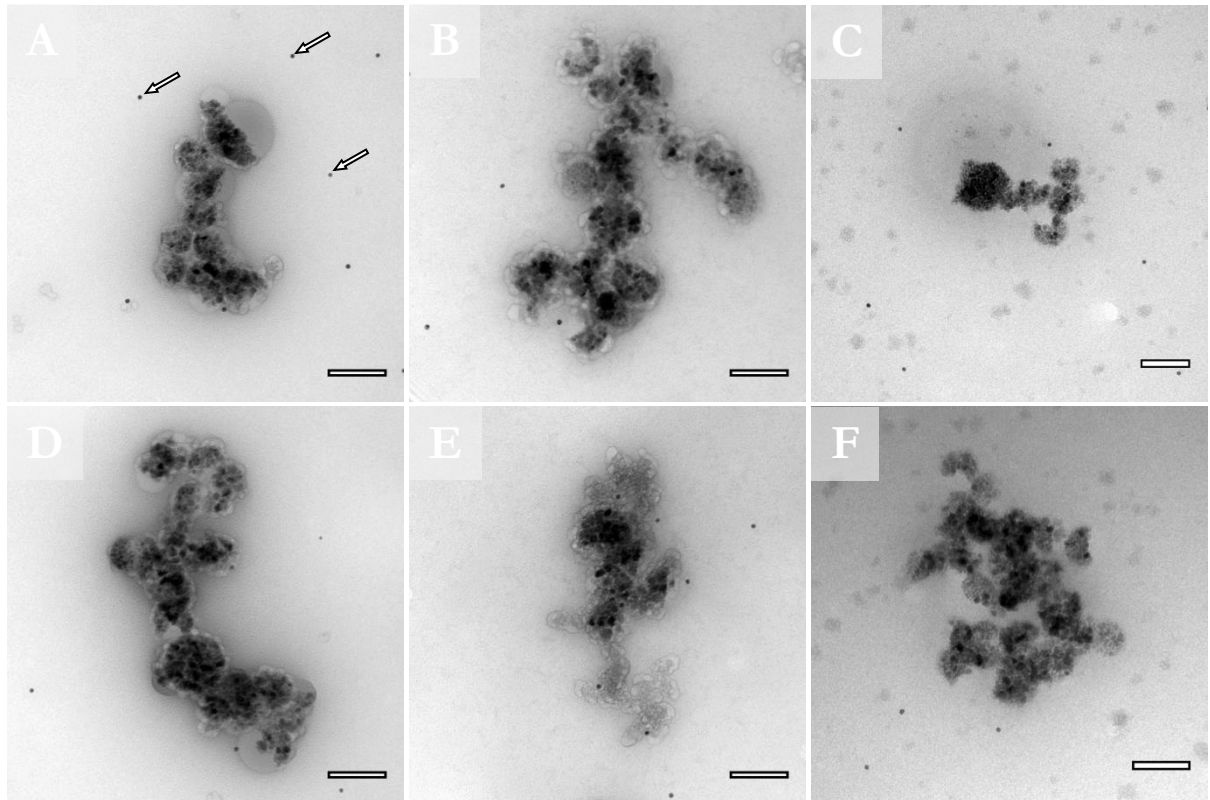


Abbildung 39: TEM-Aufnahmen von unfunktionalisierten DEMA-Partikeln; Die Partikel wurden 2 h im Brutschrank bei 37 °C mit sekundären Gold-Antikörpern inkubiert und anschließend auf Formvar beschichtete Netzen aufgetropft. Zu sehen sind die Partikel ohne spezifische Bindung der sekundären Gold-Antikörper, A: 01-MES mit 0% Humanserum, B: 01-MES mit 10% Humanserum, C: 01-MES mit 100% Humanserum, D: 01-NHS mit 0% Humanserum, E: 01-NHS mit 10% Humanserum, F: 01-NHS mit 100% Humanserum, Pfeile markieren die Gold-Partikel; Maßstab: 100 nm.

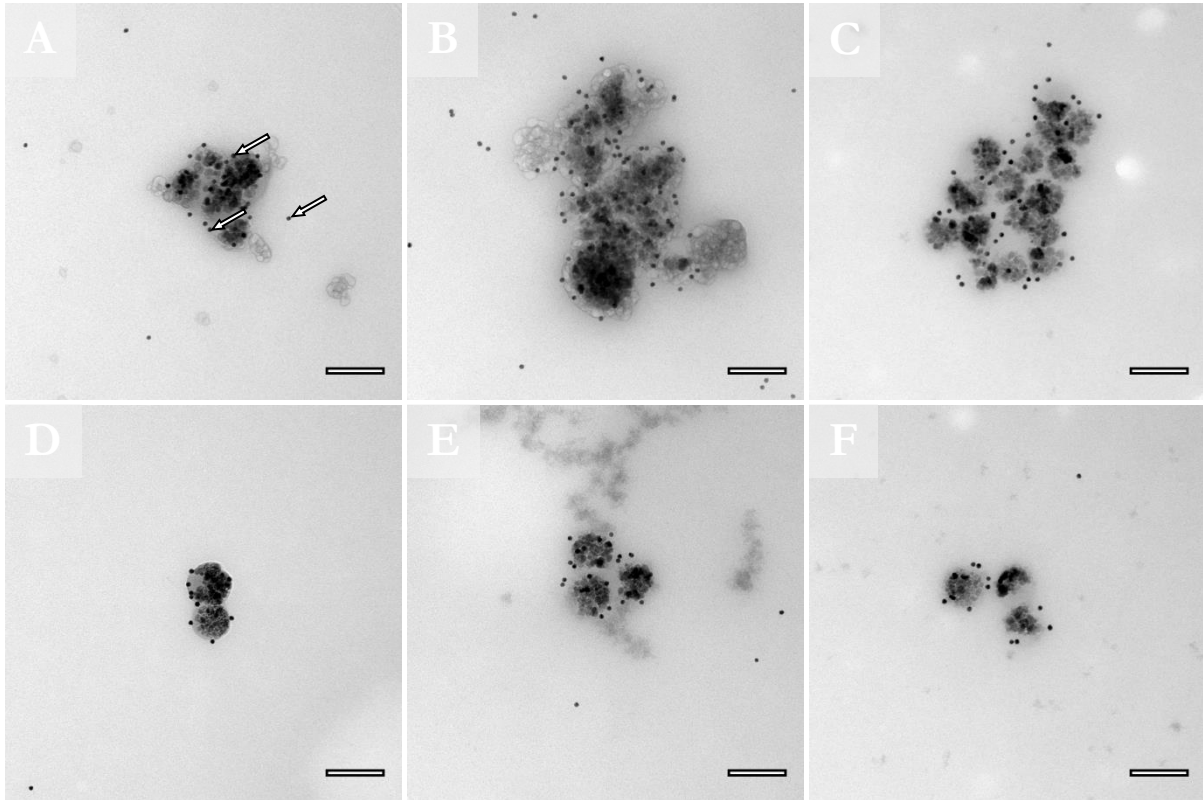


Abbildung 40: TEM-Aufnahmen von mit Anti-CD63-Antikörpern funktionalisierten DEMA-Partikeln; Die Partikel wurden 2 h im Brutschrank bei 37 °C mit sekundären Gold-Antikörpern inkubiert und anschließend auf Formvar beschichtete Netzen aufgetropft. Abgebildet sind die Partikel mit spezifischer Bindung der sekundären Gold-Antikörper, A: 03a mit 0% Humanserum, B: 03a mit 10% Humanserum, C: 03a mit 100% Humanserum, D: 03a-c2 mit 0% Humanserum, E: 03a-c2 mit 10% Humanserum, F: 03a-c2 mit 100% Humanserum, Pfeile markieren die Gold-Partikel; Maßstab: 100 nm.

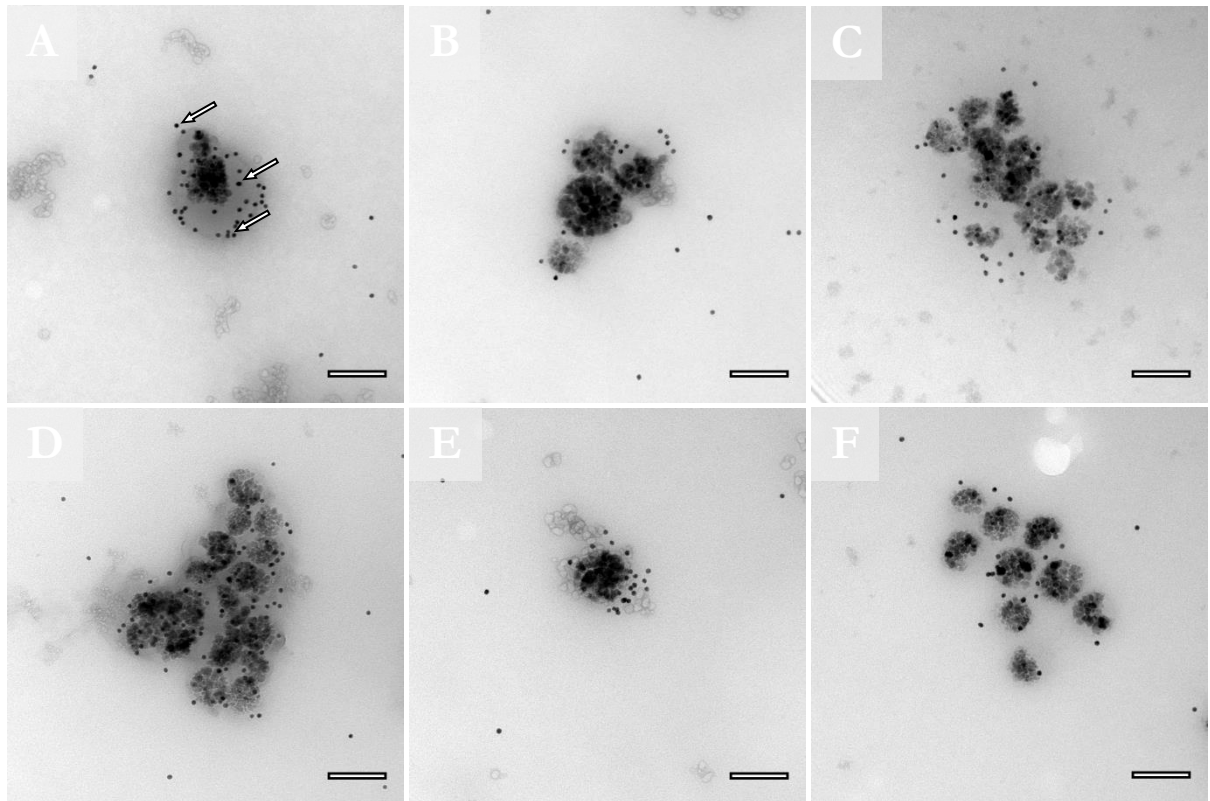


Abbildung 41: TEM-Aufnahmen von mit Maus IgG funktionalisierten DEMA-Partikeln; Die Partikel wurden 2 h im Brutschrank bei 37 °C mit sekundären Gold-Antikörpern inkubiert und anschließend auf Formvar beschichtete Netzen aufgetropft. Zu sehen sind die Partikel mit spezifischer Bindung der sekundären Gold-Antikörper, A: 06a mit 0% Humanserum, B: 06a mit 10% Humanserum, C: 06a mit 100% Humanserum, D: 06a-c mit 0% Humanserum, E: 06a-c mit 10% Humanserum, F: 06a-c mit 100% Humanserum, Pfeile markieren die Gold-Partikel; Maßstab: 100 nm.

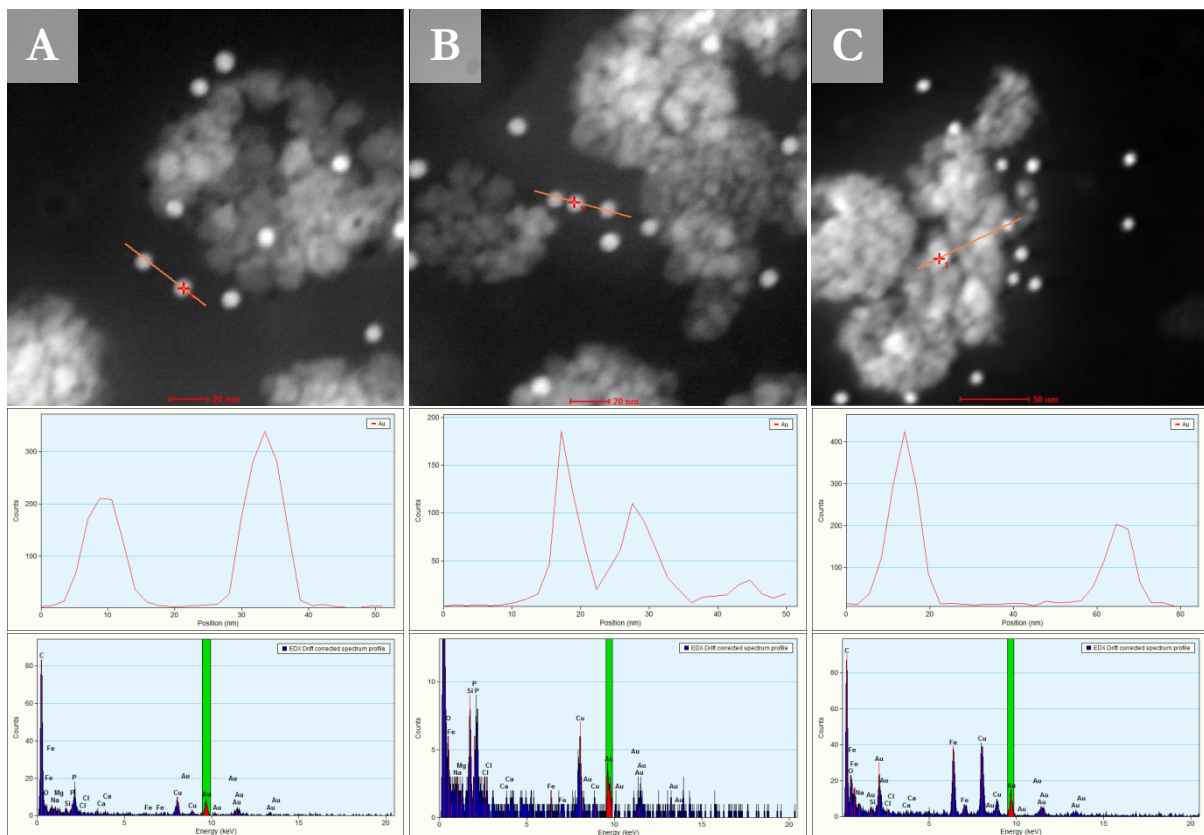


Abbildung 42: STEM-Aufnahmen von DEMA-Partikeln mittels EDX; Die Partikel wurden 2 h im Brutschrank bei 37 °C mit sekundären Gold-Antikörpern inkubiert und anschließend auf Formvar beschichtete Netzen aufgetropft. Abgebildet sind die Partikel im Negativkontrast (STEM) mit spezifischer Bindung der sekundären Gold-Antikörper. Entlang der Linie (orange) wurden EDX-Spektren aufgenommen und die relative Konzentration (in counts) gegen die Position aufgetragen, das EDX-Spektrum (unten) zeigt das EDX-Spektrum an der Position des Kreuzes (rot), A: 03a mit 100% Humanserum, B: 03a-c2 mit 100% Humanserum, C: 06a mit 100% Humanserum; Maßstab: 20 nm.

Des Weiteren wurden Zellversuche mit DEMA-Partikeln am CLSM durchgeführt. Zunächst wurden die funktionalisierten Partikel DEMA 03a zu MSCs gegeben (Membran gefärbt mit CellMask™ Deep Red) und im *live cell imaging* betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass zahlreiche Partikel von den Zellen aufgenommen werden (siehe Abbildung 43 A – C). Aufgrund der mit dem Antikörper *Anti-CD63* funktionalisierten Oberfläche war dies zu erwarten. Die Signale in den Zellen wirken bei näherer Betrachtung (siehe Abbildung 43 C) als seien mehrere Partikel zusammen in Vesikeln. Die nicht funktionalisierten Partikel DEMA 01-MES wurden ebenfalls im Zellversuch eingesetzt. Hier konnten ebenfalls Aufnahmeprozesse beobachtet werden (siehe Abbildung 43 D – F), allerdings deuteten die schwächeren Fluoreszenzsignale darauf hin, dass weniger Partikel aufgenommen werden, als bei den funktionalisierten. Daraus lässt sich schließen, dass die

Oberflächenfunktionalisierung mit *Anti-CD63*-Antikörpern tatsächlich eine spezifische Aufnahme in die Zellen bewirkt und nicht funktionalisierte Partikel daher weniger gut aufgenommen wurden.

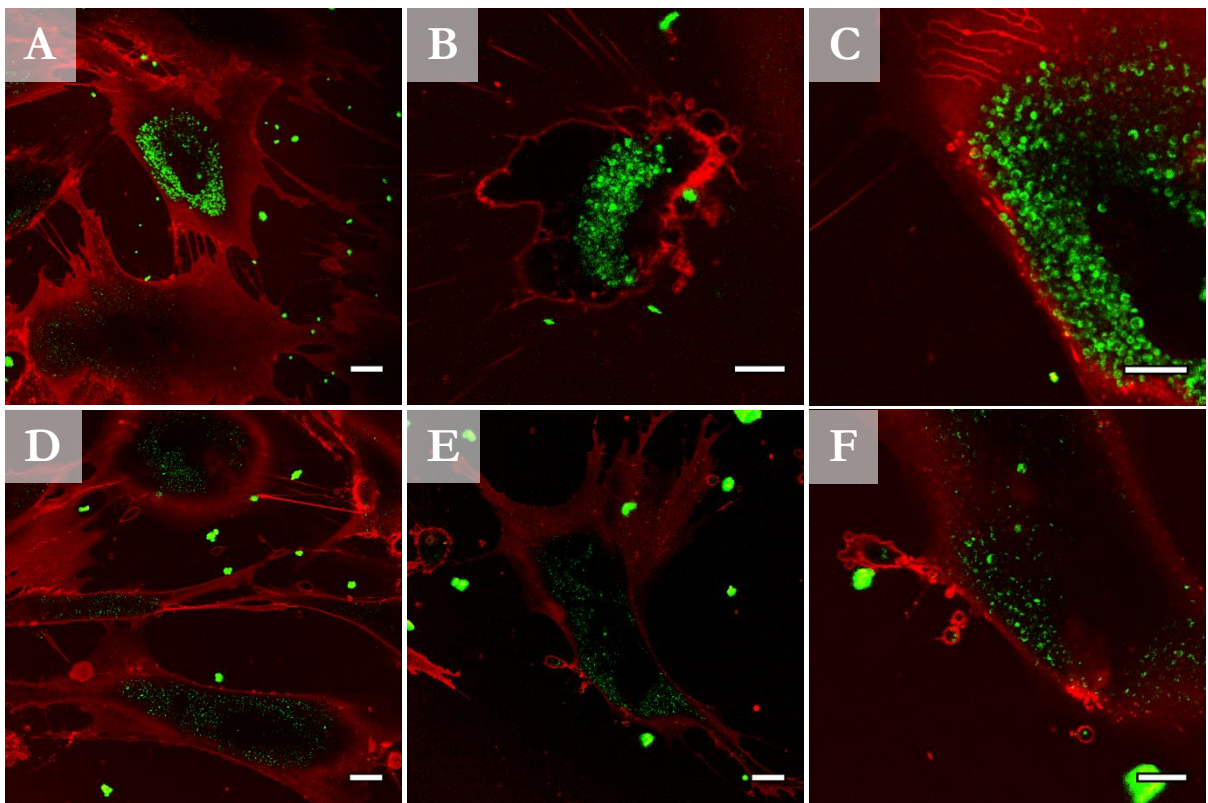


Abbildung 43: CLSM-Aufnahmen der DEMA-Partikel im Zellversuch. Zu sehen ist das Signal der Kapseln innerhalb MSCs in grün (GFP), A – C: DEMA 03a, D – F: DEMA 01-MES, Zellfärbung mit CellMask™ Deep Red; Maßstab: A, D und E: 20 μm , B, C und F: 10 μm .

Um die Morphologie der aufgenommenen Partikel in den DCs zu analysieren, wurden die magnetischen DEMA-Partikel wiederholt im Zellversuch eingesetzt und für Analysen im TEM mittels HPF präpariert. Die Partikel konnten außerhalb und innerhalb der Zellen im TEM detektiert werden (siehe Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46). Durch das enthaltene Eisenoxid sind die Partikel sehr kontrastreich und trotz zellulärer Strukturen sehr gut sichtbar. Es konnten sowohl Partikel an der äußeren Membran sowie innerhalb von Zellen in Vesikeln gefunden werden.

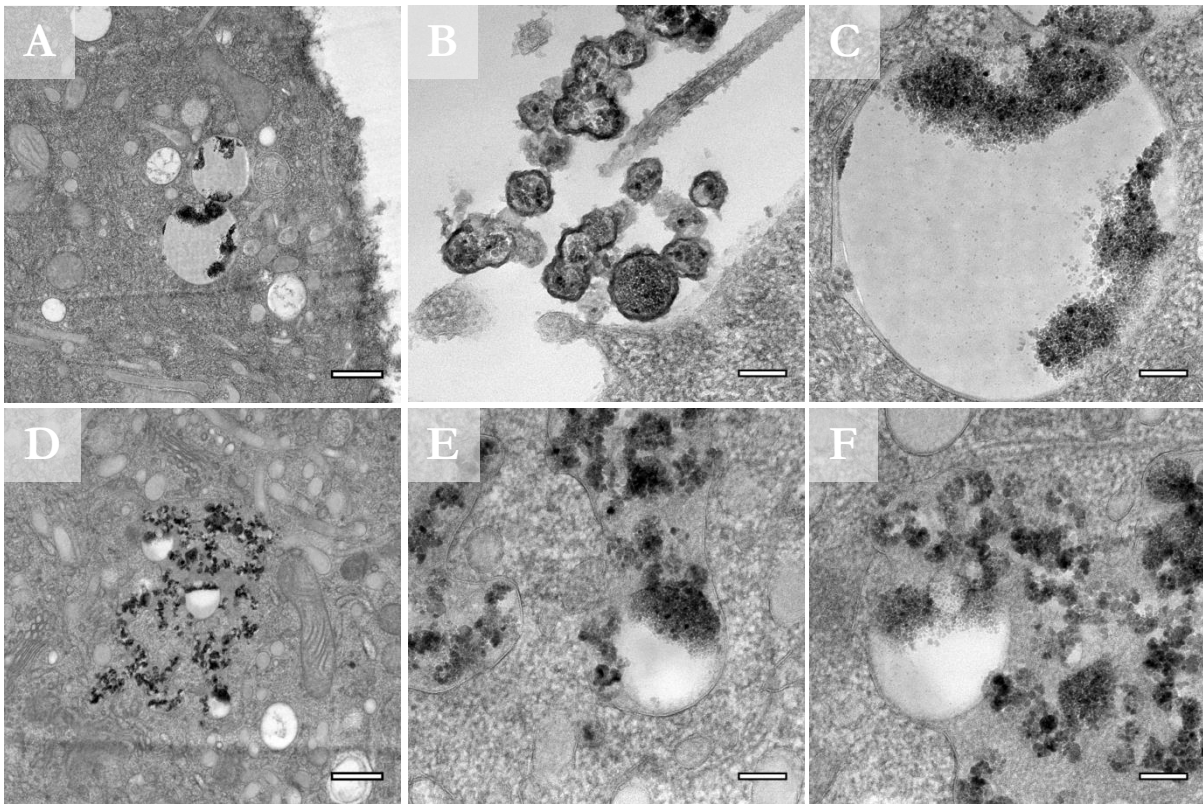


Abbildung 44: TEM-Aufnahmen der DEMA-Partikel im Zellversuch. Zu sehen sind die unfunktionalisierten Partikel außerhalb und innerhalb dendritischer Zellen, A – C: 01-MES, D – F: 01-NHS; Maßstab A und D: 500 nm, B, C, E und F: 100 nm.

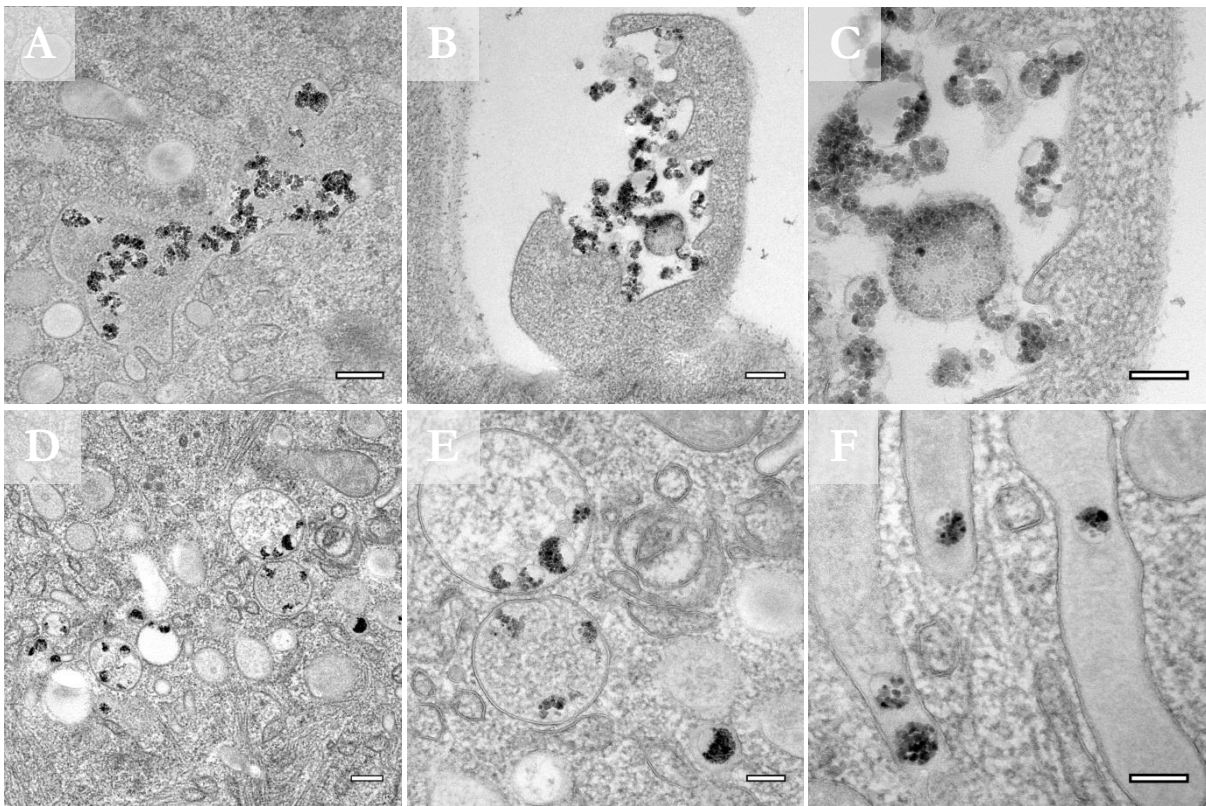


Abbildung 45: TEM-Aufnahmen der DEMA-Partikel im Zellversuch. Abgebildet sind die funktionalisierten Partikel außerhalb und innerhalb dendritischer Zellen, A – C: 03a, D – F: 03a-c2; Maßstab A, B und D: 200 nm, C, E und F: 100 nm.

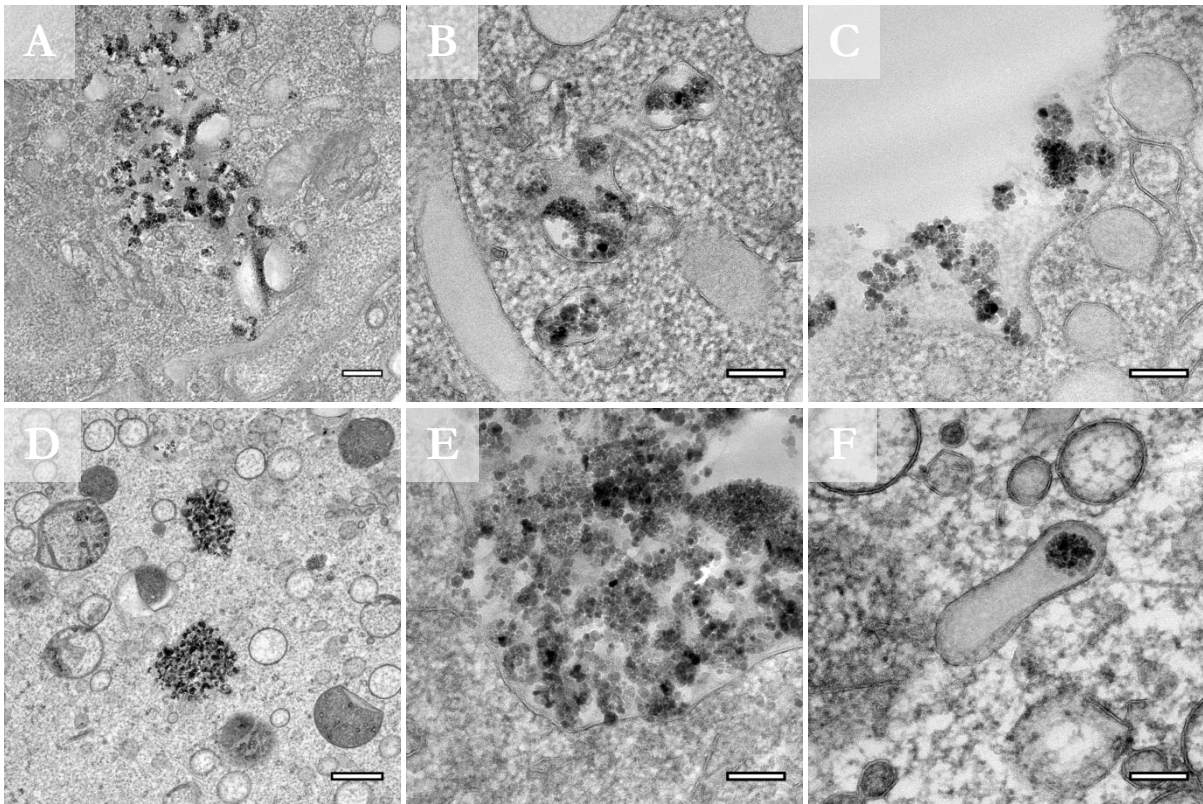


Abbildung 46: TEM-Aufnahmen der DEMA-Partikel im Zellversuch. Zu sehen sind die funktionalisierten Partikel außerhalb und innerhalb dendritischer Zellen, A – C: 06a, D – F: 06a-c; Maßstab A: 200 nm, B, C, E und F: 100 nm, D: 500 nm.

FACS®-Messungen zeigten entgegen den Untersuchungen am CLSM, dass mehr unfunktionale Partikel von den MSCs aufgenommen wurden, als funktionalisierte (siehe Abbildung 47). Auch bei den DCs konnte eine relativ hohe Aufnahme der unfunktionierten Partikel 01-MES von ca. 25% beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Alter der Partikel. Lagern die Partikel zu lange (mehr als 2 Wochen), kann es vorkommen, dass sich diese verändern oder Aggregationen bilden, was das Aufnahmeverhalten in Zellen beeinflussen kann. Die spezifische Aufnahme in die Zellen scheint dadurch beeinflusst bzw. behindert zu werden. Gut zu sehen ist hier jedoch eine höhere Aufnahme der Partikel mit gekoppelten Antikörpern (03a und 06a) im Vergleich mit den Partikeln mit adsorbierten Antikörpern (03a-c2 und 06a-c) bei den DCs. Dies zeigt auf, dass eine feste Anbindung von Antikörpern an die Partikeloberfläche eine bessere spezifische Anbindung an die Zelloberfläche gewährleistet, als es mit adsorbierten Antikörpern der Fall ist. Bei den MSCs konnte dies nicht beobachtet werden, was wiederum mit dem Alter der Partikel zusammenhängen kann oder die MSCs weisen ein anderes Aufnahmeverhalten auf, als die DCs.

Beim Herstellungszeitpunkt der Partikel sollte stets beachtet werden, wann die Versuche durchgeführt werden und es sollte stetig geplant werden, wann neue Partikel notwendig sind, um derartige Veränderungen zu vermeiden. Weiterhin sollten die Partikel stetig auf ihre Funktionsfähigkeit getestet werden, um den genauen Zeitpunkt der Veränderungen bestimmen zu können und die Lagerung der Partikel sollte definiert werden und immer gleich bleiben.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Einsatz der Zelllinien. Jeder Zelltyp kann anders auf die Partikel reagieren, auch wenn spezifische Antikörper für eine Aufnahme eingesetzt werden. Denn die Proteinzusammensetzung auf den Oberflächen von Zellen und die Aufnahmemechanismen variieren zwischen den Zelltypen. So ist es wichtig, genau die Zellen für die Versuche auszuwählen, in die die Wirkstoffe später eingebracht werden sollen.

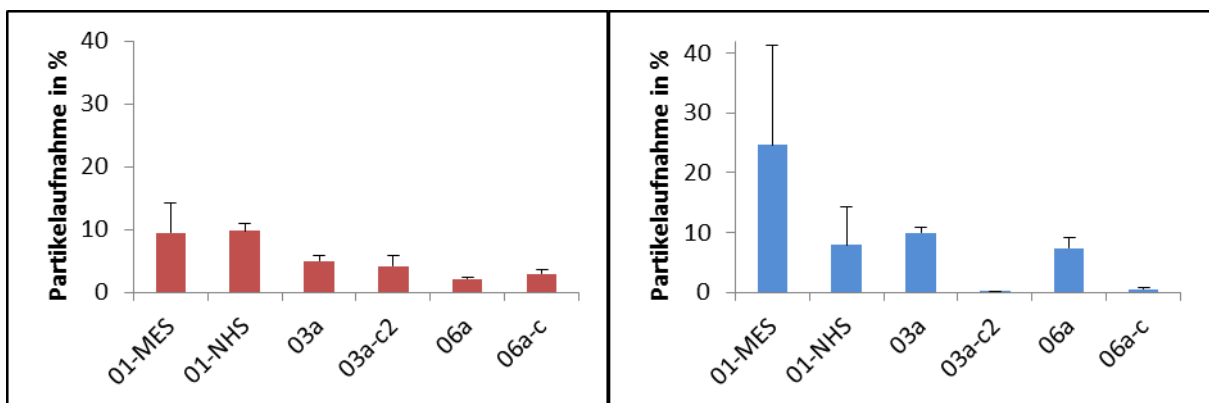


Abbildung 47: FACS®-Messungen der DEMA-Partikel. Angegeben ist die Aufnahme in % der MSCs (links, rot) und DCs (rechts, blau).

Der Test auf Toxizität der Partikel zeigte eine Viabilität der MSCs und DCs nach der Partikelinkubation für 24 h von mehr als 92% bei allen Partikeln, was darauf schließen lässt, dass die eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch wirken (siehe Abbildung 48).

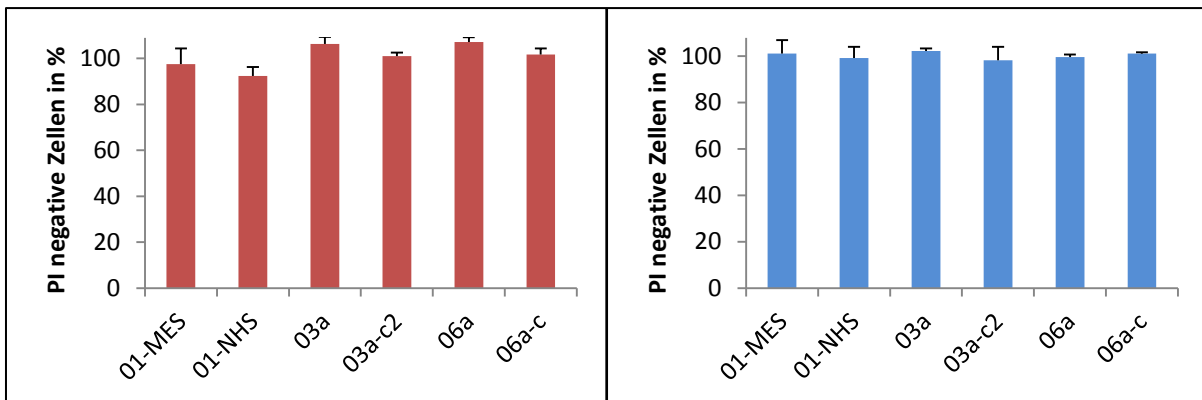


Abbildung 48: Zytotoxizitätstest der DEMA-Partikel. Angegeben sind die lebenden Zellen (PI negativ) in % der MSCs (rot, links) und der DCs (rechts, blau).

Antikörperfunktionalisierungen können durch Anbindung eines sekundären Antikörpers mit einem elektronendichten Marker, wie beispielsweise Gold, mithilfe des TEMs visuell nachgewiesen werden. Unterstützend bietet die elementanalytische Analyse einen direkten Nachweis der eingesetzten Marker und bestätigt die bildlich dargestellten Ergebnisse. Das hier enthaltene Eisenoxid konnte als kontrastreicher Marker im TEM für die Zellversuche genutzt werden und offenbarte die Morphologie der aufgenommenen Partikel, die entweder einzeln in endosomalen Vesikeln oder zu mehreren in größeren Endosomen vorlagen.

3.3.2 Nachweis von Nanohydrogelen

Als nanodimensionales Trägersystem für siRNA in Zellen wurden kationische Nanohydrogelpartikel von Dr. LUTZ NUHN hergestellt. Da diese, aus MEO₃MA und PFPMA über Blockpolymerisation synthetisierten Nanopartikel [115, 116], eine flüssige Phase enthalten und keine schweren Elemente bei der Synthese eingesetzt werden, gestaltet sich eine Analyse mittels dem TEM als schwierig. Nachfolgend wird die morphologische Untersuchung der Partikel mit bekannten sowie neuen Methoden beschrieben und der Nachweis der Partikel im Zellversuch vorgestellt.

Werden die Partikel (Ø 100 nm) mittels „Drop Casting“ (siehe 2.2.1) präpariert (siehe Abbildung 49 A), wird die Problematik des enthaltenen Wasseranteils deutlich, denn die Gele kollabierten während des Trocknungsprozesses, was eine veränderte Morphologie im Vergleich zu den Cryo-TEM-Aufnahmen zur Folge hatte (siehe Abbildung 49 B). Mit dem Cryo-TEM bleiben die Hydrogele zwar sehr gut erhalten, jedoch ist der Kontrast der Partikel sehr schwach. Außerdem gestaltete sich die

Cryo-TEM-Präparation als langwierig und aufgrund der vielen Präparationsschritte als fehleranfällig. Im Kapitel 3.2.1.5 wurden die Vor- und Nachteile der Methode bereits detailliert geschildert. Eine alternative Methode stellt die Trehalose-Einbettungstechnik (siehe Abbildung 49 C) dar. Werden die Partikel in 1% Trehalose eingebettet und mit 2% UA kontrastiert, invertiert sich der Kontrast und die Partikel sind sehr gut sichtbar. Bei dieser Methode konnten keinerlei Schrumpfungen oder Veränderungen der Partikelstrukturen erkannt werden. Vermutlich wird der Wasseranteil in den Partikeln durch Trehalose ausgetauscht, was die Struktur und Morphologie der Hydrogele konserviert. Die Methode wurde von R. HARRIS für die Präparation biologischer Proben entwickelt [117-119] und in dieser Arbeit erstmals für die Visualisierung und Analyse polymerer Nanopartikel eingesetzt.

Eine weitere alternative Methode stellt die Einbettung der Proben in eine dünne Matrix aus ionischer Flüssigkeit dar. Das Prinzip gleicht der Trehalose-Technik, nur bleibt der Matrixfilm dabei flüssig. Da ionische Flüssigkeiten praktisch keinen Dampfdruck aufweisen, ist es möglich, sie ins Hochvakuum eines Elektronenmikroskops einzubringen. Auch mit der eingesetzten ionischen Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat (EMI-Bf₄) blieben die Hydrogele nach der Präparation in einem nahezu nativen Zustand erhalten (siehe Abbildung 49 D). Ebenfalls liegt hier die Vermutung nahe, dass die Wasserphase mit der ionischen Flüssigkeit ausgetauscht und die gesamte Morphologie der Partikel aufrechterhalten wird. Der Vorteil der beiden Methoden ist die Einfachheit der Anwendung. Die Präparation dauert lediglich wenige Minuten und wird ähnlich der „Drop Casting“ Methode durchgeführt. Die TEM-Netzchen können direkt nach der Präparation im TEM analysiert oder über einige Zeit gelagert werden, ohne Veränderungen der Probenstrukturen befürchten zu müssen.

Die hier gezeigten Nachweismethoden zur Einbettung von Nanohydrogelen in Trehalose und ionischen Flüssigkeiten wurden erstmalig für diese Arbeit entwickelt und sind in RENZ ET AL. veröffentlicht [109].

Da die Hydrogele für die medizinische Anwendung hergestellt worden sind, war es wichtig zu wissen, wie sich ihre Aufnahme in Zellen auswirkt bzw. wo die Partikel nach der Zellaufnahme zu finden sind [115]. Hierfür wurden die Nanohydrogele im Zellversuch mit MSCs inkubiert, um die Aufnahme bildlich nachweisen zu können. Die Partikel konnten anhand ihrer Morphologien an der Zellmembran (siehe Abbildung 49 E) sowie innerhalb der Zellen in Vesikeln (siehe Abbildung 49 F) detektiert werden.

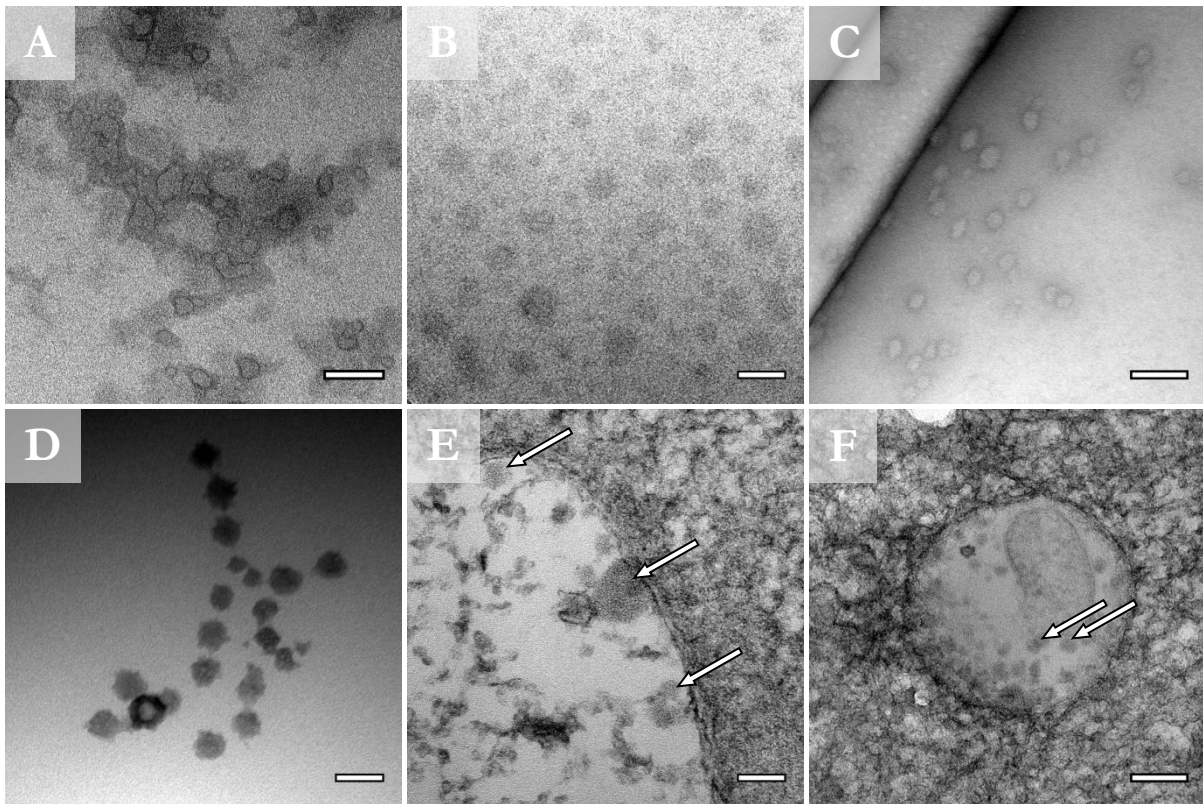


Abbildung 49: TEM-Aufnahmen von Nanohydrogelen (Ø 100 nm). Zu sehen sind die Gele mittels „Drop Casting“ und im Zellversuch, A: aufgetropft und getrocknet auf einem TEM-Netzchen, B: Cryo-TEM, C: eingebettet in 1% Trehalose mit 2% UA, D: eingebettet in einen dünnen EMI-Bf₄ Film mit 2% UA, E: außerhalb von MSCs an der Zellmembran, F: innerhalb von MSCs in einem Vesikel; Maßstab: 50 nm, C und F: 100 nm.

Es konnte visuell bestätigt werden, dass die Nanohydrogele tatsächlich von den Zellen aufgenommen werden und sich dann in endosomalen Vesikeln befinden. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da die enthaltene siRNA vorzeitig abgebaut werden könnte, sollten die Partikel in Lysosomen vorliegen. Da sie jedoch in Endosomen zu finden sind, ist die siRNA vor einem Abbau geschützt und kann langsam und kontrolliert in das Zytoplasma diffundieren und dort die gewünschte Funktion, wie die Runterregulierung von Genen, bewirken.

Die beschriebenen Nachweismethoden zeigen die Vorteile in Bezug auf medizinische polymere Trägersysteme, sodass weiche Nanohydrogelpartikel mithilfe der Trehalose-Technik und ionischen Flüssigkeiten in ihrer ursprünglichen Form dargestellt werden können, ohne Trocknungsartefakten zu unterliegen. Zudem kann mit dem TEM gezeigt werden, in welche Kompartimente die spezifisch adressierten Trägersysteme tatsächlich transportiert werden, was für ihre Funktionalität von Bedeutung ist.

3.3.3 Funktionalisierte HES-Kapseln mit Mannose/Trimannose

Für biomedizinische Anwendungen ist die spezifische Adressierung von Zellen mit modifizierten und mit spezifischen Funktionalisierungen ausgestatteten Nanoträger-Systemen von großer Bedeutung. HES-Kapseln (Hydroxyethylstärke-Kapseln) sind gut geeignet für biomedizinische Anwendungen [120], da deren Oberfläche nach der Zugabe zu biologischen Flüssigkeiten, wie Blut, weniger Proteinbindungen aufweisen, verglichen mit beispielsweise Polystyrol-Partikeln.

HES-Kapseln sollten für den bildlichen Nachweis innerhalb von DCs analysiert werden. Um unspezifische Protein-Adsorptionen und damit eine unspezifische Zellaufnahme zu verhindern, wird der sogenannte Stealth-Effekt genutzt und Polyethylenglycol (PEG) auf die Oberfläche der Kapseln gebracht [121-124]. Neue Erkenntnisse zeigten jedoch, dass eine gewisse Protein-Adsorption für die Funktionalität von PEG notwendig ist [125]. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit Mannose modifizierte PEGylierte HES-Kapseln, eine erhöhte Aufnahme in dendritische Zellen aufweisen [126]. Immature DCs können aktiv mit dem Mannose-Rezeptor CD206 Mannose terminierte Glykokonjugate internalisieren [127] ebenso wie Trimannose durch den Rezeptor DC-SIGN [128, 129].

Mithilfe des TEMs wurden PEGylierte (HES-PEG), funktionalisierte (HES-Mannose und HES-Trimannose) und unfunktionalisierte HES-Kapseln (HES) auf ihre Morphologie untersucht und anschließend in Zellen detektiert. Die durch inverse Miniemulsion synthetisierten HES-Kapseln wurden von SARAH WALD hergestellt. In vorangegangenen Experimenten mit DCs konnten Fluoreszenzsignale der Kapseln nach zweistündiger Inkubation innerhalb der Zellen detektiert werden [130]. Die Signale deuten aufgrund ihrer Größe auf eine Aggregation der Partikel hin. Zur Überprüfung der Morphologie dieses Ereignisses und um auszuschließen, dass es sich lediglich um den Farbstoff in den Zellen handelte, wurden Versuche für das TEM mittels HPF durchgeführt. Es wurden vier Varianten der modifizierten Kapseln eingesetzt und zunächst mit der Trehalose Methode mit UA im TEM analysiert. HES-Kapseln ohne modifizierte Oberfläche wiesen Größen von ca. 50 nm im TEM auf und lagerten sich zu mehreren zusammen, wie in Abbildung 50 A zu sehen ist. Die modifizierten Kapseln HES-PEG, HES-Trimannose sowie HES-Mannose wiesen im TEM Größen von ca. 250 nm auf, was mit den aus der Literatur bekannten Größen übereinstimmt [130]. Die Struktur der Kapseln zeigte durch die Einbettung in Trehalose und der Kontrastierung mit UA polydisperse Kapseln mit rauer Oberfläche (siehe Abbildung 50 B – D). Wurden die HES-Kapseln lediglich mittels „Drop

Casting“ analysiert, waren kollabierte Kapseln zu sehen und keinerlei Strukturen mehr erkennbar (siehe Abbildung 50 E und F).

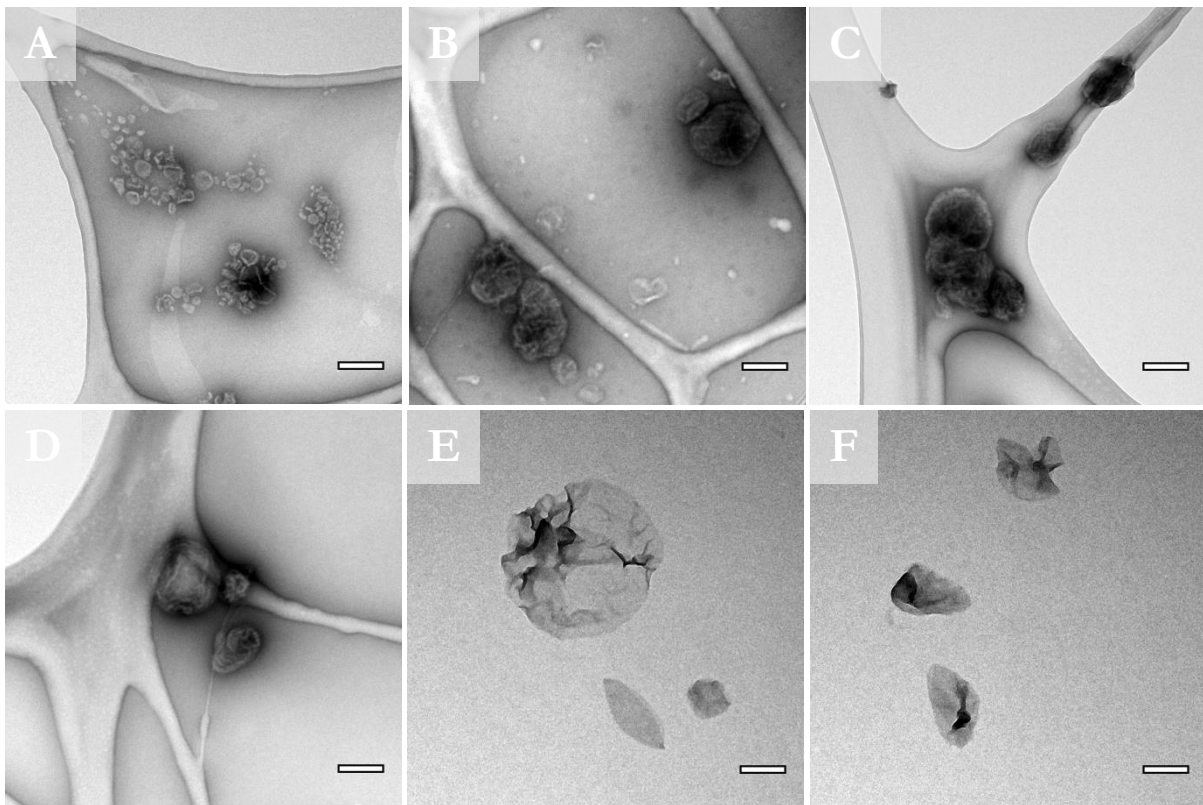


Abbildung 50: TEM-Aufnahmen von HES-Kapseln, A – D: zu sehen sind die Kapseln eingebettet in 1% Trehalose mit 4% UA auf Lacey Netzen, E – F: „Drop Casting“ der Partikel, A: HES, B: HES-PEG, C: HES-Trimannose, D – F: HES-Mannose; Maßstab 200 nm.

Für Zellversuche wurden die Kapseln vor der Präparation für das TEM zwei Stunden mit DCs im Brutschrank inkubiert. Die modifizierten Kapseln konnten häufig in sehr großen Aggregaten in den Zellen detektiert werden, aber auch, wie in Abbildung 51 A zu sehen ist, in kleineren Aggregaten in runden Vesikeln (siehe Abbildung 51 B – D). Bei näherer Betrachtung der HES-Mannose Kapseln ist die Struktur der Kapseln deutlich erkennbar (siehe Abbildung 51 E und F), wobei die Oberfläche der Kapseln, aufgrund von Agglomeraten, deformiert wurde. Die in vorangegangenen Studien nachgewiesene Aufnahme der HES-Kapseln im CLSM [130] konnte hier mittels TEM bestätigt werden. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass lediglich der Farbstoff von den Zellen aufgenommen wurde. Ob HES-Kapseln, funktionalisiert mit Mannose oder Trimannose, besser in DCs aufgenommen werden, als die unfunktionalisierten oder nur PEGylierten Partikel, konnte mit TEM nicht

nachgewiesen werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die unfunktionalisierten HES-Kapseln lediglich zu kleinen Aggregaten in Zellen vorlagen, verglichen mit beispielsweise den Mannose-funktionalisierten Kapseln (siehe Abbildung 51 A und D – F).

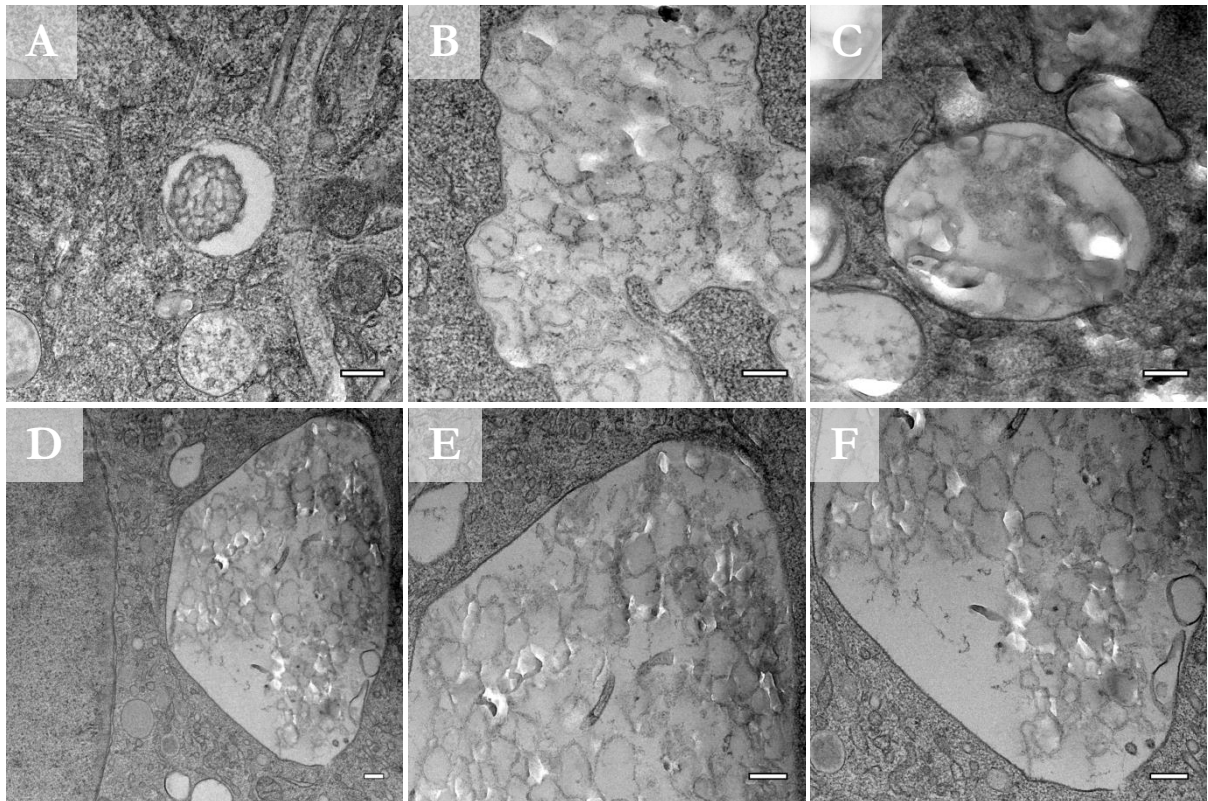


Abbildung 51: TEM-Aufnahmen der HES-Kapseln im Zellversuch. Zu sehen sind Cluster der Kapseln innerhalb dendritischer Zellen, A: HES, B: HES-PEG, C: HES-Trimannose, D – F: HES-Mannose; Maßstab 200 nm.

Die Untersuchungen der funktionalisierten HES-Kapseln mit dem TEM liefern Einblicke in die Morphologie der Kapseln. Mithilfe der Trehalose-Technik und der Kontrastierung mit UA konnte die Struktur der ansonsten kontrastarmen Kapseln betrachtet werden. Die anschließende Detektion innerhalb der dendritischen Zellen bestätigte die vorangegangenen Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop, sodass eindeutig nachgewiesen wurde, dass sich große Ansammlungen von Kapseln innerhalb von endosomalen Vesikeln befinden und es sich nicht nur um den verkapselten Fluoreszenzfarbstoff handelt. In WALD ET AL. wurden die hier gezeigten bildlichen Nachweise mittels TEM veröffentlicht [130].

Insgesamt zeigen die visuellen Nachweismethoden von Kapseln ein großes Potential für die Untersuchungen im biologischen Umfeld. Es können die beteiligten Kompartimente in der Zelle eindeutig erkannt werden und die Morphologie der Kapseln kann ebenfalls betrachtet werden. Es kann ausgeschlossen werden, dass sich Fluoreszenzfarbstoffe von den Wirkstoffträgern gelöst haben und ohne diesen in die Zelle gelangen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden polymere Nanoträger für „Drug delivery“-Systeme mithilfe von Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie in Zellsystemen identifiziert. Die sogenannte korrelative Mikroskopie vereint dabei die Vielseitigkeit der Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie mit dem hohen Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskopie, um subzelluläre Strukturen zu visualisieren und die ROI im Detail zu untersuchen. Die Schwierigkeit bestand darin, eine einfache Möglichkeit zu finden, die beiden Methoden zu kombinieren.

Die ersten Schritte einer solchen korrelativen Methode, die auf der Fluoreszenzmarkierung von mesenchymalen Stammzellen sowie dendritischen Zellen mithilfe der Transfektion von Zellen basiert, konnten hier gezeigt werden. Dabei können Strukturen oder Proteine der Zellen spezifisch markiert werden, ohne dass Fluoreszenz nach der Präparation verloren geht. Transfizierte Zellen können chemisch oder mittels Hochdruckgefrieren präpariert werden. Für die Analyse im konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) werden angefertigte Ultradünnschnitte auf Deckgläser übertragen und können anschließend daran unbeschadet mit Polyacrylsäure wieder abgelöst werden. Die Ultrastruktur kann dann im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert werden, nachdem die Schnitte auf TEM-Trägernetzchen überführt wurden. Der größte Vorteil dieser Methode ist, dass es zwischen der Untersuchung im CLSM und im TEM keine weiteren Präparationsschritte gibt, die zum Verlust von Information oder Strukturen führen können. Die detektierten Stellen im Fluoreszenzmikroskop verändern sich demnach nicht mehr bei der Übertragung ins TEM.

Die hier verwendeten, gut charakterisierten, modifizierten und mit Markern beladenen polymeren Kapseln und Partikel wurden in Zellversuchen eingesetzt und ihr Aufnahmeverhalten sowie ihre Morphologie untersucht. Durch Zytotoxizitätstests konnte gezeigt werden, dass sich die hier eingesetzten Konzentrationen der Kapseln und Partikel nicht toxisch auf die Zellen auswirkten. Um eine optimale Strukturhaltung der Zellen zu erreichen, wurde die Methode des Hochdruckgefrierens für die elektronenmikroskopische Präparation verwendet.

Alle hier eingesetzten nanopartikulären Kapsel- und Partikelsysteme konnten innerhalb von dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Mit den verwendeten Polyharnstoff- und HES-Kapseln wurden damit erstmals bildliche Nachweise von polymeren Kapseln innerhalb von Zellen mittels dem TEM erreicht. Um die Partikel im TEM eindeutig nachweisen zu können, trugen sie Marker wie

Gadolinium bzw. Quantum Dots. Neben ihrer hohen Elektronendichte für den Nachweis im TEM, besitzen die Marker weitere Vorteile: Gadolinium gilt als Kontrastierungsmittel und wird in der Medizin in der Magnetresonanztomographie eingesetzt. Die Quantum Dots sind sowohl fluoreszierend und haben gleichzeitig einen hohen Kontrast im TEM. So muss nicht zusätzlich ein fluoreszierender Farbstoff verkapselt werden, um die Nanoträger im CLSM untersuchen zu können. Die energiedispersive Röntgenspektroskopie wurde angewendet, um die verkapselten Marker im TEM nachzuweisen. So konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den detektierten Strukturen innerhalb der Zellen tatsächlich um die Kapseln handelte und nicht um kontrastreiche Zellstrukturen. Außerdem konnte die Lage des verkapselten Gadoliniums der Polyharnstoffkapseln durch die Elektronenenergieverlustspektroskopie in der Kapselhülle nachgewiesen werden. Die Tomographie der Polyharnstoffkapseln lieferte zudem eine detailliertere Morphologie der Kapseln, als es durch zweidimensionale Abbildungen möglich ist.

HES-Kapseln, die in vorangegangenen Studien in dendritischen Zellen nachgewiesen wurden, wurden mit dem TEM auf ihre Ultrastrukturen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass es sich um große Aggregationen der Kapseln handelte.

Magnetische DEMA-Partikel, die mit Antikörpern auf ihrer Oberfläche funktionalisiert waren, wurden mit sekundären Antikörpern inkubiert, die Goldpartikel als Marker trugen. Mittels TEM konnten die Antikörperbindungen nachgewiesen werden, was einen bildlichen Nachweis über die Funktionalisierung lieferte. Es wurde außerdem festgestellt, dass der Alterungsprozess der Partikel einen Einfluss auf das Aufnahmeverhalten in die Zelle hat. Spezifische Aufnahmemechanismen werden dadurch verändert, Aggregationen bilden sich aus und verändern die Beobachtungen im Vergleich zu frisch hergestellten Partikeln.

Neben den Zellversuchen wurden die polymeren Kapseln außerhalb biologischer Systeme am TEM untersucht. Zur bildlichen Darstellung der polymeren Kapseln mittels TEM konnten neue Methoden entwickelt werden, die Artefakte durch Trocknung verhindern und schnell und einfach anwendbar sind. Trehalose oder ionische Flüssigkeiten betten die Kapseln in einen Film ein und erhalten deren Struktur. Zusätzlich kann das Kontrastierungsmittel Uranylacetat eingesetzt werden, um den Kontrast der Strukturen zu erhöhen und um die Kapseln zu fixieren. Nanohydrogele konnten mithilfe dieser Methoden besser erkannt werden. Denn im Zellversuch war es schwierig, die Gele zu detektieren.

Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern gute Grundlagen für die weitere Untersuchung polymerer Kapselsysteme in biologischen Umgebungen. So können mithilfe der Transfektion spezifische

Proteine für die verschiedenen Aufnahmemechanismen wie Phagozytose oder Endozytose eingesetzt werden oder frühe und späte Endosomen unterschieden werden, um festzustellen, über welchen Weg die Kapseln aufgenommen werden und in welchen Kompartimenten sie verbleiben bzw. wohin sie transportiert werden. Zudem stellt sich die Frage, wie sich die systematische Abhängigkeit der Eigenschaften der Nanokapseln, wie Größe, Zetapotential, Seitengruppen der Kapsel Materialien, auf die Aufnahme- und Transportwege auswirken.

Wichtig ist zudem zu wissen, ob sich Partikel und Kapseln mit der Zeit verändern und damit ihre Spezifität verlieren können. Es bedarf einer Strukturierung von Herstellungszeitpunkt, Lagerung und Zeitpunkt der Versuche. Zudem sollte der Zeitpunkt der Veränderungen, wie Aggregatbildungen, bekannt sein.

Summary

In the present work, polymeric nanocarriers for drug delivery systems were characterized using fluorescence- and electron microscopy in cellular environments. The so-called correlative microscopy combines the versatility of light- or fluorescence microscopy with the high resolution of electron microscopy to visualize subcellular structures and to examine the ROI in detail. The challenge was to find an efficient way to combine the two methods.

Here, the first steps of such a correlative method based on fluorescent labeling of mesenchymal stem cells and dendritic cells using the transfection of cells could be shown. With this technique cell structures or proteins can be specifically labeled, without losing fluorescence due to preparation steps. Transfected cells can be prepared chemically or by high pressure freezing. To analyze samples in confocal laser scanning microscope, ultrathin sections are transferred to coverslips. Afterwards they can be removed with polyacrylic acid easily and without any damage. After transferring the sections to TEM grids, the ultrastructure can be analyzed by TEM. The biggest advantage of this method is that there are no further preparation steps between the investigation in CLSM and TEM, which can lead to loss of information. Accordingly, there is no change of the detected points in the fluorescence microscope during the transfer into the TEM.

The polymeric capsules and particles used here were well characterized, modified and loaded with markers. They were applied in cell experiments to examine their morphology and cellular uptake. All particles and capsules proved to be non-toxic in the investigated concentration range. To achieve an optimal structure preservation of cells, the method of high pressure freezing for electron microscope sample preparation was used.

All capsule and particle systems used here could be identified within dendritic cells. With the herein used polyurea- and HES-capsules, the first visual evidence of polymeric capsules was achieved within cells by TEM. For easy identification, the capsules were loaded with markers such as gadolinium or Quantum Dots. In addition to their high electron density for the detection in the TEM, the markers provide additional benefits: Gadolinium is used as a contrasting agent in medicine, specifically in magnetic resonance imaging. Quantum Dots are both fluorescent and simultaneously have a high contrast in TEM. Thus, encapsulation of an additional fluorescent dye is not necessary in order to examine the nanocarrier in CLSM. The method of energy dispersive X-ray spectroscopy was used to

detect the encapsulated marker in the TEM. Thus, it was clearly demonstrated that the detected structures were the capsules rather than, e.g. artifacts and that they retained their cargo during the preparation and imaging process. Furthermore, the position of the encapsulated gadolinium in polyurea capsules could be detected by electron energy loss spectroscopy in the capsule shell. A more detailed morphology of the polyurea capsules was obtained by electron tomography.

The ultrastructure of HES-capsules that have been detected in the previous studies in dendritic cells were examined by TEM. It was found that there were large aggregates of capsules inside the cells.

Magnetic DEMA-particles functionalized with antibodies on their surface were incubated with secondary gold-antibodies to investigate their presence by TEM. This would provide a visual evidence of the functionalization. It was also demonstrated that the aging process of particles has an effect on the cell uptake mechanisms. Specific uptake mechanisms are changed by forming agglomerates and modify the observations compared to the freshly prepared particles.

In addition to cell experiments, the polymeric capsules were investigated outside of biological systems using TEM. For visual representation of the polymeric capsules by TEM new methods have been investigated that prevent artefacts caused by drying and are simultaneously quick and easy to use. Trehalose or ionic liquids were used to embed the capsules in a thin film and preserve their structures. Additionally, the contrasting agent uranyl acetate can be used to enhance the contrast of structures and to fix the capsules.

The results presented here provide a good foundation for further studies of polymeric capsule systems in biological environments. In order to determine which uptake or transport mechanism, as well as which compartment is involved, specific proteins can be labeled by application of the transfection techniques. Moreover, there is the question of how characteristics like size, zeta potential, and side groups of capsule material could affect the uptake and transport mechanisms.

It is also important to know if particles and capsules are stable or if they change over time and therefore lose their specificity. Investigating this requires coordinating the time of manufacture, storage and time of the experiments. In addition, the 'best used before' point, such as aggregate formation, should be known.

Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

AGT	O-6-alkylguanine DNA alkyltransferase	O-6-Alkylguaninalkyltransferase
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
CdTe	Cadmium telluride	Cadmiumtellurid
CLSM	Confocal laser scanning microscope	Konfokales Laserrastermikroskop
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DLS	Dynamic Light Scattering	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDX	Energy dispersive X-ray spectroscopy	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EELS	Electron energy loss spectroscopy	Elektronenenergieverlustspektroskopie
EM	Electron microscope	Elektronenmikroskop
EMI Bf ₄	1-Ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate	1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat
EPR-Effekt	Enhanced permeability and retention	Erhöhte Permeabilität und Retention
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elemental specific imaging	Elementspezifische Abbildung
FACS®	Fluorescence-activated cell sorting	Durchflusszytometrie
FBS	Fetal bovine serum	Fetales Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein	Grün fluoreszierendes Protein
HeLa	<u>Henrietta Lacks</u>	
HES	Hydroxyethyl starch	Hydroxyethylstärke
HPF	High pressure freezing	Hochdruckgefrieren
kDa	Kilodalton	Kilodalton

LB	Lysogeny broth	Komplexmedium
mL	Mililiter	Mililiter
MEO ₃ MA	Tri(ethylene glycol) methyl ether methacrylate	Tri(ethylenglycol)methylether methacrylat
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MR	Magnetic resonance	Magnetresonanztomographie
mRNA	Messenger RNA	Boten-RNA
MSC	Mesenchymal stem cell	Mesenchymale Stammzellen
NEB	New England BioLabs	
nm	Nanometer	Nanometer
PBG	Blocking buffer	Blockadepuffer
PEG	Polyethylene glycol	Polyethylenglycol
PFMA	Pentafluoropropyl methacrylate	Pentafluorphenylmethacrylat
PI	Propidium iodide	Propidiumiodid
QDots	Quantum Dots	Quantenpunkt
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest	Interessenbereich
SE	Secondary electrons	Sekundärelektronen
STEM	Scanning TEM	Raster-TEM
TDI	Toluene 2,4-diisocyanate	Toluol-2,4-diisocyanat
TEM	Transmission electron microscope	Transmissionselektronenmikroskop
TMR	Tetramethylrhodamine	Tetramethylrhodamin
UA	Uranyl acetate	Uranylacetat

B Experimenteller Teil und Materialien

B.1 Nanokapseln und -partikel

Die in dieser Arbeit verwendeten nanopartikulären Systeme wurden von Projektpartnern hergestellt. Aus diesem Grund wird nachfolgend lediglich auf das Konzept der Präparationen eingegangen und der grundsätzliche Aufbau der Nanokapseln bzw. Nanopartikel erläutert. Die Synthese der Polymere wird kurz erklärt.

B.1.1 Polyharnstoffkapseln

Die Kapseln wurden aus den Polyharnstoffmonomeren 1,4-Diaminobutan und 1,6-Diisocyanatohexan (siehe Abbildung A) durch inverse Miniemulsion von ISABEL SCHLEGEL entsprechend vorangegangener Arbeiten hergestellt [131]. Als Markierung für die Versuche in zellulären Systemen wurden entweder QDots (*Qtracker*[®] 800 oder CdTe) oder das Kontrastmittel Gadobutrol (*Gadovist*[®], Abbildung B) verkapselt. Zusätzlich wurde als Marker für Messungen am CLSM Cy5-Oligo oder SR101 verkapselt. Lediglich die Kapseln mit QDots erhielten keinen zusätzlichen Marker.

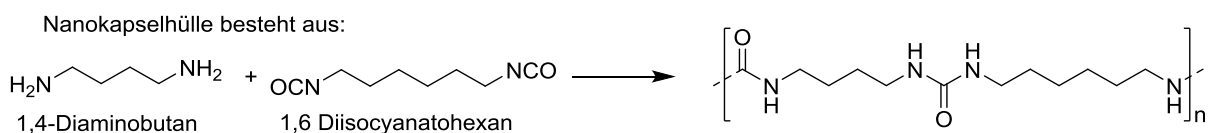


Abbildung A: Zusammensetzung der Kapselhülle der Polyharnstoffkapseln.

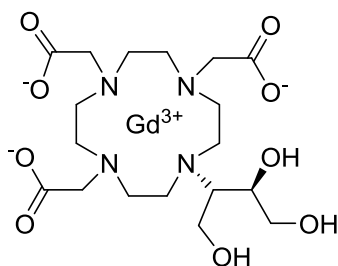


Abbildung B: Strukturformel von Gadovist[®] (Gadobutrol).

Die Verkapselung von QDots wurde zunächst mit dem *Qtracker*[®] 800 *Cell Labeling Kit* durchgeführt. Jedoch war die Konzentration an QDots zu gering, sodass lediglich rund 0,1 QDot pro Kapsel erwartet

wurden. Daraufhin wurden CdTe-QDots verkapselt, deren Konzentration bedeutend höher war, sodass ca. 10 QDots pro Kapsel zu erwarten waren.

B.1.2 Magnetische Polystyrolpartikel (DEMA-Partikel)

Die Synthese hydrophober Oleat-stablisierter Eisenoxidpartikel wurde entsprechend vorangegangener Arbeiten von KATJA KLEIN durchgeführt [132]. Die mit GFP fluoreszenzmarkierten magnetischen Polystyrolpartikel wurden nach Literaturvorschrift via Miniemulsion synthetisiert und mit Carboxylsäuregruppen funktionalisiert [111, 133]. Eine Immobilisation von Antikörpern auf den magnetischen Polystyrolpartikeln wurde zum einen mittels chemischer Anbindung und zum anderen durch physische Adsorption nach Literaturangaben erreicht [111]. Die eingesetzten Partikel sind in Tabelle A aufgeführt.

Tabelle A: Verwendete magnetische Polystyrolpartikel, zu sehen sind die Bezeichnungen der DEMA-Partikel mit der entsprechenden Antikörperfunktionalisierung sowie der Feststoffgehalt.

Name	Antikörper	Feststoffgehalt
DEMA03a	CD63 (Kopplung)	400 µg/mL
DEMA03a-c2	CD63 (Adsorption)	590 µg/mL
DEMA06a	Maus IgG (Kopplung)	520 µg/mL
DEMA06a-c	Maus IgG (Adsorption)	440 µg/mL
DEMA01-MES	Unfunktionalisierte Kontrolle (nicht aktiviert)	12000 µg/mL
DEMA01-NHS	Unfunktionalisierte Kontrolle (aktiviert)	12000 µg/mL

B.1.3 Nanohydrogele

Die Synthese von kationischen Nanohydrogelpartikeln wurde von DR. LUTZ NUHN durchgeführt [116]. Dabei wurden amphiphile Reaktivester-Block-Copolymere verwendet, die zur Selbstassemblierung neigen. Die Herstellung der Vorläuferpolymere erfolgte über RAFT-Polymerisationen aus Tri(ethylenglycol)methylethermethacrylat (MEO₃MA) und Pentafluorphenylmethacrylat (PFMA). Markiert wurden die Partikel durch kovalente Anbindung von Oregon Green [115, 116].

B.1.4 HES-Kapseln

Hydroxyethylstärke-modifizierte Kapseln (HES) wurden von SARAH WALD via inverser Miniemulsion (Wasser-in-Öl) durch Polyaddition von HES mit Toluol 2,4-diisocyanat (TDI) entsprechend vorangegangener Arbeiten synthetisiert [134-137]. Die Oberfläche der Nanokapseln wurde zunächst mit Polyethylenglycol (PEG) funktionalisiert, um eine Proteinadsorption zu minimieren. Anschließend erfolgte der Transfer mit DBCO in Wasser, um Trimannose oder Mannose Linker via kupferfreier Klickreaktion an die Kapseloberfläche zu binden. Die Kapseln wurden außerdem mit Farbstoff Cy5-Oligo beladen.

B.2 Vorbereitung von Saphir-Discs

Zu untersuchende Zellen für die Elektronenmikroskopie wurden für das Hochdruckgefrieren auf kohlebeschichteten Saphir-Discs ausgesät. Die Saphirscheiben dienten als Trägermaterial der Zellen und die Kohleschicht als Trennschicht zwischen Zellen und Trägermaterial.

Zur Reinigung wurden die Discs jeweils 15 min mit 60%iger Schwefelsäure, Seifenlösung, H₂O und 100% Ethanol im Ultraschallbad behandelt, nach jedem Schritt mit Wasser gespült und bis zur Verwendung in 100% Ethanol gelagert. Mittels Hochvakuum-Beschichtungssystem erfolgte die Beschichtung der Scheiben mit Kohle. Es wurde eine Schicht von ca. 20 nm aufgedampft und die Zahl „2“ als Markierung dieser Seite eingeritzt. Dickere Schichten sollten vermieden werden, da sich diese bei der Substituierung ablösen kann. Vor dem Einsatz im Zellversuch wurden die Saphirdiscs für mindestens 6 h bei 120 °C im Ofen getempert. Bei Lagerung der übrigen Discs wurde der Vorgang des Temperns vor der Versuchsdurchführung wiederholt, um zu verhindern, dass Luftfeuchtigkeit die Kohleschicht ablöst. Ein Beglimmen der Discs in einer Plasmaanlage sorgte für eine negative Ladung auf der Oberfläche (hydrophile Oberfläche), was das Anwachsen der Zellen erleichterte. Teilweise wurden bei nicht adhären Zellen oder Partikeln die vorbereiteten Saphirblättchen mit 1% Poly-L-Lysin beschichtet, um ein besseres Anhaften zu gewährleisten.

Die Discs wurden nach der Behandlung mit Plasma steril in Wellplatten oder *Ibidis* überführt, wobei die eingeritzte „2“ nach oben zeigte, sodass die Zellen auf der Kohleschicht anwachsen konnten. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben vorbereitet (siehe 2.1.1.4) und vorsichtig auf die Discs

gegeben. Wurden mehrere Saphirs in ein Well gegeben, musste darauf geachtet werden, dass sie nicht übereinander liegen und so die Fläche zum Aufwachsen abgedeckt wurde.

B.3 Poly-L-Lysin Beschichtung von Deckgläsern, Objektträgern und Saphirdiscs

Um zu verhindern, dass sich Ultradünnschnitte bei der Immunmarkierung von den Deckgläsern ablösen, wurden die Gläschen mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) beschichtet. Hierfür wurden runde Deckgläser mit 70% EtOH gereinigt und mit Milli-Q H₂O gewaschen. Nach dem Trocken auf Filterpapier wurden die Gläser in eine 0,01%ige Poly-L-Lysin (0,1% Stocklösung wurde 1:10 verdünnt mit Milli-Q) getaucht und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gläser einzeln auf Filterpapier für ca. 1 h bei 60 °C getrocknet und bis zur Verwendung staubfrei in Glaspetrischalen aufbewahrt.

B.4 Schnitte ablösen mit Polyacrylsäure

Für korrelative Versuche wurde von fertig eingebetteten Proben 200 nm dicke Schnitte angefertigt und auf Deckgläser überführt. Nachdem die Messungen am CLSM durchgeführt wurden, konnten die Schnitte mit Hilfe von Polyacrylsäure abgelöst werden. Dazu wurde jeweils ein Tropfen Polyacrylsäure pro Schnitt aufgetropft und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurde der getrocknete Tropfen vorsichtig mit einer Rasierklinge vom Deckglas gelöst und mit der Oberseite nach unten in eine Schale mit deionisiertem Wasser überführt. Im Wasser löste sich die feste Polyacrylsäure auf und der Schnitt schwamm an der Oberfläche. Von dort konnte er wie üblich mit einem Loop aufgenommen und auf ein TEM-Netzchen überführt werden. Die Schnitte überstanden die Prozedur ohne Schaden, sodass ein und derselbe Schnitt sowohl am CLSM als auch am TEM betrachtet werden konnte.

B.5 Verwendete Chemikalien

Tabelle B: Verwendete Chemikalien mit Hersteller und Firmensitz.

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
1-Hexadecen	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Aceton	Fisher Scientific	Massachusetts, USA
BSA	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
CellMask™ Deep Red	Invitrogen	Carlsbad, USA
CellMask™ Green	Invitrogen	Carlsbad, USA
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Epoxy Embedding Medium kit	Fluka® Analytical	Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
EMI-BF ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Fluoroshield™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Gelatine	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Gadovist®	Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
HaloTag® TMR Ligand	Promega Corporation	Madison, USA
Immersionsöl	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mowiol®-Lösung	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Osmiumtetroxid	Carl Roth®	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™ Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Polyacrylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
SNAP-Cell® TMR-Star	New England Biolabs	Massachusetts, USA
SNAP-Cell® TMR-Star	New England Biolabs	Massachusetts, USA
D-(+)-Trehalose, Dihydrat	Fisher BioReagents	Massachusetts, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Uranylacetat-dihydrat	Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
Qtracker® 800 Cell Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Massachusetts, USA
CdTe-QDots	PlasmaChem GmbH	Berlin, Deutschland

B.5.1 Medien und Seren

Tabelle C: Verwendete Medien und Seren mit Hersteller und Firmensitz für die entsprechenden Zelllinien.

Bezeichnung	Eingesetzt für	Hersteller	Firmensitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Invitrogen; U. S. A.	HeLa-Zellen	Invitrogen™/ Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	HeLa-Zellen, MSCs	Lonza	Walkersville, USA
Humanserum	DCs	Lonza	Walkersville, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S) 100x	HeLa-Zellen, MSCs, DCs	Invitrogen™/ Life technologies	Darmstadt, Deutschland
α-MEM	MSCs	Lonza	Walkersville, USA
2.5% Trypsin	HeLa-Zellen, MSCs	Life technologies	Carlsbad, Kalifornien
MSCGM-CD™ BulletKit®	MSCs	Lonza	Basel, Schweiz
RPMI 1640	DCs	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
IL4	DCs	PromoCell GmbH	Heidelberg, Deutschland
GMCSF	DCs	Sanofi-Aventis	Bridgewater, NJ, USA

B.5.2 Antikörper

Tabelle D: Verwendete Antikörper mit Hersteller und Firmensitz.

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Molecular Probes®/ Life technologies	Carlsbad, Kalifornien
LEAF Purified anti-human CD63, Mouse IgG1	Biozol	85386 Eching
12 nm Colloidal Gold AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L)	Jackson	West Grove, PA, USA 19390
Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase antibody	Abcam®	Cambridge CB4 0FL, UK

B.5.3 Fixan für Chemische Fixierung

Als Fixierlösung wurden jeweils 2 mL einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung (w/w) hergestellt. Dieses Volumen reichte zur Fixation von Zellen in einem 8er Ibidi. Dazu wurden 0,2 mL 25%ige Glutaraldehydlösung mit 1,8 mL 0,2 M PBS-Pufferlösung gemischt und auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Fixierlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt, da die fertige Lösung nur wenige Tage haltbar ist.

B.5.4 Herstellung von Osmiumtetroxidlösungen

Verwendet wurde eine 4%ige wässrige Osmiumtetroxidlösung (w/w), hergestellt aus grünen Kristallen, die in Glasampullen erworben wurden. Die fertige Lösung wurde im Kühlschrank gelagert und ersetzt, sobald eine schwarze Verfärbung auftrat. Aufgrund des hohen Dampfdrucks und seiner Toxizität erfolgte die Handhabung von OsO_4 ausschließlich unter dem Abzug.

B.5.5 Herstellung von Uranylacetatlösungen

Für die HPF-Versuche wurden 2%ige wässrige Uranylacetatlösungen aus 2 g UA und 100 mL H_2O bidest. hergestellt. Um Schnitte nachträglich zu kontrastieren, wurden gesättigte Lösungen in 50% EtOH hergestellt und vor der Anwendung filtriert.

B.5.6 Herstellung von Trehalose-Lösungen

Um Partikel und Kapseln im TEM eingebettet darzustellen, bietet sich die Methode der Trehalose-Einbettung an. Dabei wird die wässrige Phase der Probe mit der Trehalose-Lösung ausgetauscht. Hierfür wurde 1% Trehalose in H_2O bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Eine weitere Möglichkeit Partikel zu fixieren und zu kontrastieren bietet die Infiltration mit Trehalose und UA. Hierfür wurde in eine 1% Trehalose-Lösung 4% UA gegeben, gelöst und anschließend filtriert. Die Lösung muss lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert werden.

Die Partikel wurden auf ein Lacey-Netzchen gegeben und für ca. 1 min inkubiert. Danach wird ein Tropfen einer 1% Trehalose- oder 1% Trehalose-Lösung mit 4% UA auf den Tropfen gegeben und für ca. 5 min inkubiert. Anschließend wird der Tropfen vorsichtig am Rand mit einem Filterpapier abgezogen und die Proben nach dem vollständigen trocknen im TEM betrachtet.

B.5.7 Ionische Flüssigkeiten

Um Partikel mit ionischen Flüssigkeiten für das TEM zu präparieren, wurde 1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate (EMI-BF₄) verwendet. Es wurde entweder ohne Staining verwendet oder mit 2% UA eine Staining-Lösung hergestellt.

Für die Präparation wurde pro Probe ein Tropfen der ionischen Flüssigkeit auf ein Lacey-Netzchen gegeben, das Grid herumgedreht und ein Tropfen der Partikel-Probe auf die andere Seite gegeben. Nach ca. 5 min Inkubation wurde die Flüssigkeit am Rand mit einem Präzessionstuch abgesaugt und die übrige Flüssigkeit abgeblottet bis auf dem Netzchen keine ionische Flüssigkeit mehr zu sehen ist. Anschließend können die Proben im TEM betrachtet werden.

B.5.8 Substitutionsmedium für die Gefriersubstitution

Für eine Substitutionslösung von 9 mL (für 9 Proben) wurden 9 mg UA, 450 µL 4%ige wässrige OsO₄-Lösung und 8,55 mL Aceton vermischt.

B.5.9 Herstellung von Einbettungsmedien (EPON)

Zur Einbettung der Proben wurde Polymerharz EPON verwendet. Bestehend aus zwei Stammlösungen, die mehrere Monate im Kühlschrank lagerbar sind, wurde die Lösung vor jedem Versuch frisch hergestellt. Stammlösung I enthält 155 g EPON 812 und 250 g Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid und Stammlösung II besteht aus 200 g EPON 812 und 178 g Methyladicanhydrid. Die Gebrauchslösung setzt sich aus 60 mL Stammlösung I, 40 mL Stammlösung II und 1,5 mL Härter Tris(dimethylaminomethyl)phenol zusammen.

B.5.10 Herstellung von Blockadepuffer PBG

Zur Maskierung unspezifischer Bindungstellen für Immunmarkierungen wurde der Blockadepuffer PBG verwendet. Dafür wurden 0,2% Gelatine in PBS gegeben und durch erwärmen auf einer

Heizplatte unter stetigem Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen wurde 0,5% BSA zugesetzt und die Lösung direkt verwendet.

B.6 Verwendete Materialien

Tabelle E: Verwendete Materialien mit Hersteller und Firmensitz.

Material	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Aluplättchen	Aluminium-Plättchen	Wohlwend GmbH	Sennwald, Schweiz
Kupergrids	Cu-Grids 300 Mesh	Plano GmbH	Wetzlar, Deutschland
Lacey Netzchen	Lacey-Kohlefilm auf Cu-Netzchen, 300 mesh	Plano GmbH	Wetzlar, Deutschland
Ibidi	Open μ -Slide 8 Well Glass Bottom	ibidi GmbH	Martinsried, Deutschland
Ibidi	μ -Dish 35 mm, high Grid-50 Glass Bottom	ibidi GmbH	Martinsried, Deutschland
Deckgläschen rund	Deckgläser 13 mm	Plano GmbH	Wetzlar, Deutschland
Diamantmesser	Ultra 35° knives	Diatome AG	Biel, Schweiz
Plasmidisolations-Kit	QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (25)	Qiagen	Hilden, Deutschland

B.7 Verwendete Geräte

Tabelle F: Verwendete Geräte mit Hersteller und Firmensitz.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
CLSM	Confocal laser scanning microscope Leica SP5 II with CWSTED	Leica	Wetzlar, Deutschland
FACS®	Partec CyFlow® ML	Sysmex Partec GmbH	Görlitz, Deutschland
Hochdruckgefrierer	HPF Compact 01	Engineering Office M. Wohlwend GmbH	Sennwald, Schweiz
Hochvakuum-Beschichtungssystem	Leica EM MED020	Leica	Wetzlar, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Plasmaanlage	Femto	Diener electronic GmbH + Co. KG	Ebhausen, Deutschland
Strecktisch	TW27	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
TEM	FEI Tecnai™ F20	FEI	Oregon, USA
Ultramikrotom	Leica EM UC7	Leica	Wetzlar, Deutschland
Zellzähler	TC10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA
Zentrifuge	5810R and 5430	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

B.8 Verwendete Software

Tabelle G: Verwendete Software mit Hersteller und Version.

Software	Hersteller	Version
Blender™	Blender Foundation	2.77a
ChemBioDraw® Ultra	CambridgeSoft Corporation	14
Cygwin	Red Hat, Inc.	6.1
DigitalMicrograph	Gatan Inc.	1.7
ES Vision	FEI Company	4.1
etomo	Boulder Laboratory for 3-D Electron Microscopy of Cells	4.5
FCSExpress V4	De Novo Software	4
ImageJ	National Institutes of Health	1.48q
IMOD	Boulder Laboratory for 3-D Electron Microscopy of Cells	4.5
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)	Leica	4.3

Literaturverzeichnis

1. Kurth, T., et al., *CLEM on Ultrathin Sections*, in *Imaging & Microscopy*. 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: GIT VERLAG. p. 16-18.
2. Hell, S.W., *Microscopy and its focal switch*. *Nat Methods*, 2009. **6**(1): p. 24-32.
3. Verkade, P., *Moving EM: the Rapid Transfer System as a new tool for correlative light and electron microscopy and high throughput for high-pressure freezing*. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2008. **230**(2): p. 317-328.
4. Polishchuk, R.S., et al., *Correlative light-electron microscopy reveals the tabular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane*. *Journal of Cell Biology*, 2000. **148**(1): p. 45-58.
5. Kolotuev, I., Y. Schwab, and M. Labouesse, *A precise and rapid mapping protocol for correlative light and electron microscopy of small invertebrate organisms*. *Biology of the Cell*, 2010. **102**(2): p. 121-132.
6. Schwarz, H. and B.M. Humbel, *Correlative light and electron microscopy using immunolabeled resin sections*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2007. **369**: p. 229-56.
7. Takizawa, T. and J.M. Robinson, *Correlative microscopy of ultrathin cryosections in placental research*. *Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols*, Vol 1, 2006. **121**: p. 351-369.
8. Vicidomini, G., et al., *High Data Output and Automated 3D Correlative Light-Electron Microscopy Method*. *Traffic*, 2008. **9**(11): p. 1828-1838.
9. Kukulski, W., et al., *Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision*. *Journal of Cell Biology*, 2011. **192**(1): p. 111-119.
10. Eberle, D., et al., *Outer Segment Formation of Transplanted Photoreceptor Precursor Cells*. *Plos One*, 2012. **7**(9).
11. Fabig, G., et al., *Labeling of Ultrathin Resin Sections for Correlative Light and Electron Microscopy*, in *Correlative Light and Electron Microscopy*, T. MullerReichert and P. Verkade, Editors. 2012. p. 75-93.
12. Karp, G., *Molekulare Zellbiologie*. 2005: Springer Berlin Heidelberg.
13. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions*, in *Annual Review of Biophysics*. 2008, Annual Reviews: Palo Alto. p. 65-95.
14. Ganten, D., *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*. *Handbuch der Molekularen Medizin*, ed. K. Ruckpaul and SpringerLink. 1997, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
15. Rink, L., *Immunologie für Einsteiger*, ed. A. Kruse, H. Haase, and SpringerLink. 2012, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
16. Schütt, C., *Grundwissen Immunologie*. 3 ed, ed. B. Bröker and SpringerLink. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
17. Jenkins, A.D., et al., *Glossary of basic terms in polymer science (the 1996 IUPAC Recommendations)*. *Polimery*, 1998. **43**(9): p. 559-564.
18. Davis, S.S., *Biomedical applications of nanotechnology - Implications for drug targeting and gene therapy*. *Trends in Biotechnology*, 1997. **15**(6): p. 217-224.
19. Twaites, B., C.D. Alarcon, and C. Alexander, *Synthetic polymers as drugs and therapeutics*. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. **15**(4): p. 441-455.

20. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(3): p. 329-347.
21. Stone, G.W., et al., *A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(3): p. 221-231.
22. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
23. Gunatillake, P.A. and R. Adhikari, *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European Cells & Materials, 2003. **5**(January-June Cited May 23, 2003): p. 1-16.
24. Ikada, Y. and H. Tsuji, *Biodegradable polyesters for medical and ecological applications*. Macromolecular Rapid Communications, 2000. **21**(3): p. 117-132.
25. Vert, M., et al., *Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 1992. **3**(6): p. 432-446.
26. Hofmann, D., et al., *Knowledge-Based Approach towards Hydrolytic Degradation of Polymer-Based Biomaterials*. Advanced Materials, 2009. **21**(32-33): p. 3237-3245.
27. Cai, Q., et al., *Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin*. Biomaterials, 2003. **24**(4): p. 629-638.
28. Edlund, U. and A.C. Albertsson, *Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery*. Degradable Aliphatic Polyesters, 2002. **157**: p. 67-112.
29. Desai, M.P., et al., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(11): p. 1568-1573.
30. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. Biochemical Journal, 2004. **377**: p. 159-169.
31. Landfester, K., *Polyreactions in Miniemulsions*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. **22**(12): p. 896-936.
32. Gonsalves, K., et al., *Biomedical Nanostructures*. 2007: Wiley.
33. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
34. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
35. Dreher, M.R., et al., *Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers*. Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(5): p. 335-344.
36. Har-el, Y.E. and Y. Kato, *Intracellular delivery of nanocarriers for cancer therapy*. Current Nanoscience, 2007. **3**(4): p. 329-338.
37. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(5): p. 631-651.
38. Mittelman, D. and J.H. Wilson, *The fractured genome of HeLa cells*. Genome Biology, 2013. **14**(4).
39. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
40. NEB. 15.06.2016; Available from: <https://www.neb.com/products/n9184-psnapf-adr2-control-plasmid>.
41. Reimer, L., *Electron microscopic methods of investigation and preparation*. Electron microscopic methods of investigation and preparation. 1967: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York. 2nd enlarged ed. xii+598p. Illus.

42. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Research, 1979. **7**(6): p. 1513-1523.
43. Williams, D.B. and C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. 2009: Springer.
44. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. Vol. 16. 1998: Spektrum Akademischer Verlag.
45. Bleyl, D.W.R., *H. Plattner und H.-P. Zingsheim: Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. 335 Seiten, 90 Abb., 23 Tab. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1987. Preis: 68,— DM. Food / Nahrung, 1988. **32**(10): p. 938-938.
46. Geyer, G., *Ultrahistochemie: histochem. Arbeitsvorschriften f. d. Elektronenmikroskopie 2., überarb. u. erw. Aufl.* 1973: Fischer, VEB.
47. Vanhecke, D., W. Graber, and D. Studer, *Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing*, in *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*, T.D. Allen, Editor. 2008. p. 151-164.
48. Moor, H. and U. Riehle, *Snap-freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze-etching*. Proceedings 4th European Reg. Conf. Electron Microscopy 1968. **2**: p. 33-34.
49. Studer, D., M. Michel, and M. Muller, *High pressure freezing comes of age*. Scanning Microscopy, 1989: p. 253-269.
50. Buser, C. and P. Walther, *The structure and behavior of liquid water*. Journal of Microscopy, 2008. **230**(2): p. 268-277.
51. Walther, P. and A. Ziegler, *Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water*. Journal of Microscopy, 2002. **208**: p. 3-10.
52. McIntosh, R., D. Nicastro, and D. Mastronarde, *New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography*. Trends in Cell Biology, 2005. **15**(1): p. 43-51.
53. Frey, T.G., G.A. Perkins, and M.H. Ellisman, *Electron tomography of membrane-bound cellular organelles*, in *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2006, Annual Reviews: Palo Alto. p. 199-224.
54. Marco, S., et al., *Electron tomography of biological samples*. Biochemistry-Moscow, 2004. **69**(11): p. 1219-+.
55. Lucic, V., F. Forster, and W. Baumeister, *Structural studies by electron tomography: From cells to molecules*, in *Annual Review of Biochemistry*. 2005, Annual Reviews: Palo Alto. p. 833-865.
56. Kremer, J.R., D.N. Mastronarde, and J.R. McIntosh, *Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD*. Journal of Structural Biology, 1996. **116**(1): p. 71-76.
57. Ladinsky, M.S., et al., *Golgi structure in three dimensions: Functional insights from the normal rat kidney cell*. Journal of Cell Biology, 1999. **144**(6): p. 1135-1149.
58. Egerton, R.F., *Electron energy-loss spectroscopy in the TEM*. Reports on Progress in Physics, 2009. **72**(1): p. 016502.
59. Engelhardt, M., *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse. Von Peter Fritz Schmidt und 13 Mitautoren. 810 S. mit 643 Bildern und 304 Literaturstellen. Expert Verlag Renningen 1994, (Kontakt & Studium; Bd. 444; Meßtechnik), 168,— DM, ISBN 3-8169-1038-6. Materials and Corrosion, 1995. 46(7): p. 434-434.*
60. Autrata, R., et al., *A BSE scintillation detector in the (S)TEM*. Scanning, 1986. **8**(1): p. 3-8.
61. Seiler, H., *Einige aktuelle Probleme der Sekundarelektronenemission*. Zeitschrift Fur Angewandte Physik, 1967. **22**(3): p. 249-8.
62. Peters, K.R., *Conditions required for high quality high magnification images in secondary electron-I scanning electron microscopy*. Scanning Electron Microscopy, 1982: p. 1359-1372.

63. Pawley, J.B., *Handbook of biological confocal microscopy, Second edition*. Handbook of biological confocal microscopy, Second edition, ed. J.B. Pawley and J.B. Pawley. 1995. xxiii+632p.
64. Minsky, M., *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. Scanning, 1988. **10**(4): p. 128-138.
65. Winter, R. and F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie*. 1998: Teubner.
66. Wilhelm, S., et al., *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*, C. Zeiss, Editor.: Carl Zeiss Jena GmbH.
67. Agronskaia, A.V., et al., *Integrated fluorescence and transmission electron microscopy*. Journal of Structural Biology, 2008. **164**(2): p. 183-189.
68. Griffiths, G., et al., *On the preparation of cryosections for immunocytochemistry*. Journal of Ultrastructure Research, 1984. **89**(1): p. 65-78.
69. Tokuyasu, K.T., *A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues*. Journal of Cell Biology, 1973. **57**(2): p. 551-565.
70. van Rijnsoever, C., V. Oorschot, and J. Klumperman, *Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections*. Nature Methods, 2008. **5**(11): p. 973-980.
71. Lucic, V., et al., *Multiscale imaging of neurons grown in culture: From light microscopy to cryo-electron tomography*. Journal of Structural Biology, 2007. **160**(2): p. 146-156.
72. Sartori, A., et al., *Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography*. Journal of Structural Biology, 2007. **160**(2): p. 135-145.
73. Spiegelhalter, C., et al., *From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9014.
74. Murk, J., et al., *Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography*. Journal of Microscopy-Oxford, 2003. **212**: p. 81-90.
75. Studer, D., B.M. Humbel, and M. Chiquet, *Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution*. Histochemistry and Cell Biology, 2008. **130**(5): p. 877-889.
76. Monaghan, P., N. Perusinghe, and M. Muller, *High-pressure freezing for immunocytochemistry*. Journal of Microscopy, 1998. **192**: p. 248-258.
77. Luft, J.H., *Improvements in epoxy resin embedding methods*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1961. **9**(2): p. 409-&.
78. Glauert, A.M. and R.H. Glauert, *Araldite as an Embedding Medium for Electron Microscopy*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1958. **4**(2): p. 191-&.
79. Spurr, A.R., *A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy*. Journal of Ultrastructure Research, 1969. **26**(1-2): p. 31-43.
80. Keppler, A., et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(1): p. 86-89.
81. Los, G.V., et al., *HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis*. ACS Chemical Biology, 2008. **3**(6): p. 373-382.
82. Perkovic, M., et al., *Correlative Light- and Electron Microscopy with chemical tags*. Journal of Structural Biology, 2014. **186**(2): p. 205-213.

83. Keppler, A., et al., *Labeling of fusion proteins of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro*. *Methods*, 2004. **32**(4): p. 437-444.
84. Juillerat, A., et al., *Engineering substrate specificity of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells*. *Chembiochem*, 2005. **6**(7): p. 1263-1269.
85. NEB. 14.06.2016; Available from: <https://www.neb.com/products/s9105-snap-cell-tmr-star#tabselect0>.
86. Giepmans, B.N.G., et al., *Review - The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. *Science*, 2006. **312**(5771): p. 217-224.
87. Kogure, T., et al., *A fluorescent variant of a protein from the stony coral Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy*. *Nature Biotechnology*, 2006. **24**(5): p. 577-581.
88. Miller, L.W. and V.W. Cornish, *Selective chemical labeling of proteins in living cells*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005. **9**(1): p. 56-61.
89. Graham, T.R. and M.M. Kozlov, *Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010. **22**(4): p. 430-436.
90. Loussert Fonta, C. and B.M. Humbel, *Correlative microscopy*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2015. **581**: p. 98-110.
91. Behrman, E.J., *The Chemistry of osmium tetroxide fixation*. Revel, J.-P., T. Barnard and G. H. Haggis. 1984. 1-6.
92. Maupinzamier, P. and T.D. Pollard, *Actin filament destruction by osmium tetroxide*. *Journal of Cell Biology*, 1978. **77**(3): p. 837-852.
93. Karreman, M.A., et al., *Optimizing immuno-labeling for correlative fluorescence and electron microscopy on a single specimen*. *Journal of Structural Biology*, 2012. **180**(2): p. 382-386.
94. Causton, B.E., *Does the embedding chemistry interact with tissue? The science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis.*, ed. B.R. In: Müller M, Boyde A, Wolosewick JJ (eds) 1986, SEM Inc., AMF O'Hare: Scanning Electron Microscopy, Inc., Illinois 1985. 209-214.
95. Causton, B.E., D.E. Ashhurst, and R.G. Butcher, *Resins: Toxicity, hazards and safe handling*. *PROC. R. MICROSC. SOC.*, 1981. **16**(4): p. 265-267.
96. Causton, B.E., *The choice of resins for electron immunocytochemistry*. In: Polak JM, Varndell IM *Immunolabelling for electron microscopy*. Elsevier Science Publishers. 1984, Amsterdam. 29-36.
97. Gibbons, I.R., *An Embedding Resin Miscible with Water for Electron Microscopy*. *Nature*, 1959. **184**(4683): p. 375-376.
98. Matsko, N. and M. Mueller, *Epoxy resin as fixative during freeze-substitution*. *Journal of Structural Biology*, 2005. **152**(2): p. 92-103.
99. Wang, L., B.M. Humbel, and E.W. Roubos, *High-pressure freezing followed by cryosubstitution as a tool for preserving high-quality ultrastructure and immunoreactivity in the Xenopus laevis pituitary gland*. *Brain Research Protocols*, 2005. **15**(3): p. 155-163.
100. Acetarin, J.D., E. Carlemalm, and W. Villiger, *Developments of new Lowicryl resins for embedding biological specimens at even lower temperatures*. *Journal of Microscopy-Oxford*, 1986. **143**: p. 81-88.
101. Carlemalm, E., R.M. Garavito, and W. Villiger, *Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature*. *Journal of Microscopy-Oxford*, 1982. **126**(MAY): p. 123-143.

102. Newman, G.R. and J.A. Hobot, *Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1987. **35**(9): p. 971-981.
103. Scala, C., et al., *A new acrylic resin formulation: a useful tool for histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigations*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1992. **40**(11): p. 1799-1804.
104. Newman, G.R., et al., *Resin microscopy and on-section immunocytochemistry*. Resin microscopy and on-section immunocytochemistry. 1993: Springer-Verlag, Heidelberger Platz 3, D-1000 Berlin, Germany; Springer-Verlag New York, Inc., 175 Fifth Avenue, New York, New York 10010, USA. xix+221p.
105. Villiger, W., *Lowicryl resins*. Hayat, M. A. 1991. 59-72.
106. Schwarz, H. and B. Humbel, *Correlative Light and Electron Microscopy Using Immunolabeled Sections*, in *Electron Microscopy*, J. Kuo, Editor. 2014, Humana Press. p. 559-592.
107. Hofmann, D., et al., *Drug delivery without nanoparticle uptake: delivery by a kiss-and-run mechanism on the cell membrane*. Chemical Communications, 2014.
108. Rusconi, F., et al., *Quantification of sodium dodecyl sulfate in microliter-volume biochemical samples by visible light spectroscopy*. Anal Biochem, 2001. **295**(1): p. 31-7.
109. Renz, P., et al., *Imaging of Polymeric Nanoparticles: Hard Challenge for Soft Objects*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2016.
110. Martin, D., *Elektronenmikroskopische Studien über polymere Nanopartikel und ihr Potential für biomedizinische Anwendungen*. 2010.
111. Tonigold, M., et al., *Targeting by the Protein Corona: Preadsorption of antibodies outperforms chemical coupling on nanocarriers*. 2016, Submitted.
112. Salvati, A., et al., *Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface*. Nature nanotechnology, 2013. **8**(2): p. 137-143.
113. Illum, L., et al., *Adsorption of monoclonal antibodies to polyhexylcyanoacrylate nanoparticles and subsequent immunospecific binding to tumour cells in vitro*. International journal of pharmaceutics, 1983. **17**(1): p. 65-76.
114. Cedervall, T., et al., *Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(7): p. 2050-2055.
115. Kaps, L., et al., *In Vivo Gene-Silencing in Fibrotic Liver by siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles*. Advanced Healthcare Materials, 2015. **4**(18): p. 2809-2815.
116. Nuhn, L., et al., *Size-Dependent Knockdown Potential of siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles*. Biomacromolecules, 2014. **15**(11): p. 4111-4121.
117. Harris, J.R. and R.W. Horne, *Negative staining: A brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities*. Micron, 1994. **25**(1): p. 5-13.
118. Harris, J.R. and D. Scheffler, *Routine preparation of air-dried negatively stained and unstained specimens on holey carbon support films: a review of applications*. Micron, 2002. **33**(5): p. 461-480.
119. Harris, J.R., *Negative staining across holes: Application to fibril and tubular structures*. Micron, 2008. **39**(2): p. 168-176.
120. Baier, G., et al., *Suppressing Unspecific Cell Uptake for Targeted Delivery Using Hydroxyethyl Starch Nanocapsules*. Biomacromolecules, 2012. **13**(9): p. 2704-2715.

121. Dai, Q., C. Walkey, and W.C.W. Chan, *Polyethylene Glycol Backfilling Mitigates the Negative Impact of the Protein Corona on Nanoparticle Cell Targeting*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014. **53**(20): p. 5093-5096.
122. Walkey, C.D., et al., *Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(4): p. 2139-2147.
123. Kang, B., et al., *Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers*. *Biomaterials*, 2015. **49**: p. 125-134.
124. Shan, X., et al., *In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly (ethylene-glycol)-modified PLA (BAB type) triblock copolymer*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009. **72**(2): p. 303-311.
125. Schottler, S., et al., *Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers*. *Nature Nanotechnology*, 2016. **11**(4): p. 372-377.
126. Kang, B., et al., *Carbohydrate-Based Nanocarriers Exhibiting Specific Cell Targeting with Minimum Influence from the Protein Corona*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015. **54**(25): p. 7436-7440.
127. Martinez-Pomares, L., *The mannose receptor*. *Journal of leukocyte biology*, 2012. **92**(6): p. 1177-1186.
128. Feinberg, H., et al., *Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR*. *Science*, 2001. **294**(5549): p. 2163-2166.
129. Guo, Y., et al., *Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004. **11**(7): p. 591-598.
130. Wald, S., et al., *Synthesis of clickable oligosaccharides*. 2016, Submitted.
131. Malzahn, K., et al., *Design and Control of Nanoconfinement to Achieve Magnetic Resonance Contrast Agents with High Relaxivity*. *Adv Healthc Mater*, 2015.
132. Bannwarth, M.B., et al., *Colloidal Polymers with Controlled Sequence and Branching Constructed from Magnetic Field Assembled Nanoparticles*. *ACS nano*, 2015. **9**(3): p. 2720-2728.
133. Bannwarth, M.B., et al., *Reversible Redox-Responsive Assembly/Disassembly of Nanoparticles Mediated by Metal Complex Formation*. *Chemistry of Materials*, 2014. **26**(3): p. 1300-1302.
134. Baier, G., et al., *Suppressing Unspecific Cell Uptake for Targeted Delivery Using Hydroxyethyl Starch Nanocapsules*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(9): p. 2704-2715.
135. Baier, G., et al., *Cross-Linked Starch Capsules Containing dsDNA Prepared in Inverse Miniemulsion as "Nanoreactors" for Polymerase Chain Reaction*. *Biomacromolecules*, 2010. **11**(4): p. 960-968.
136. Freichels, H., et al., *(Oligo)mannose functionalized hydroxyethyl starch nanocapsules: en route to drug delivery systems with targeting properties*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013. **1**(34): p. 4338-4348.
137. Landfester, K., A. Musyanovych, and V. Mailaender, *From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using the Miniemulsion Process*. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2010. **48**(3): p. 493-515.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer eukaryotischen Zelle.....	3
Abbildung 2: Plasmidkarte des Kontroll-Plasmids pSNAP _F -ADRβ2	12
Abbildung 3: Strahlengänge eines Transmissionselektronenmikroskops	17
Abbildung 4: Schema des Strahlengangs eines CLSMs.....	24
Abbildung 5: Schema der Reaktion von SNAP-Cell® TMR Star mit dem SNAP-Tag-Fusionsprotein.....	31
Abbildung 6: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	32
Abbildung 7: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	32
Abbildung 8: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	33
Abbildung 9: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	33
Abbildung 10: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	34
Abbildung 11: CLSM-Aufnahmen von transfizierten MSCs mit dem Kontroll-Plasmid pSNAP _F -ADRβ2.....	34
Abbildung 12: Übersichtsbilder für die Korrelation von CLSM und TEM	35
Abbildung 13: Übersichtsbilder für die Korrelation von CLSM und TEM	35
Abbildung 14: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit den isolierten Plasmiden aus Bakterien	37
Abbildung 15: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter MSCs mit Anti-CD63-Antikörpern.....	40
Abbildung 16: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter MSCs mit Anti-alpha 1 Natrium Potassium ATPase-Antikörpern	40
Abbildung 17: CLSM-Aufnahmen immunmarkierter HeLas mit Anti-alpha 1 Natrium Potassium ATPase-Antikörpern	40
Abbildung 18: REM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln aufgetropft aus Cyclohexan.....	44
Abbildung 19: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln aufgetropft und getrocknet	45
Abbildung 20: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln eingebettet in 1% Trehalose	46
Abbildung 21: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln eingebettet in 1% Trehalose mit 4% UA	46
Abbildung 22: Elementspezifische Analyse von Polyharnstoffkapseln IS-98 mittels EDX	47
Abbildung 23: Elementspezifische Analyse von Polyharnstoffkapseln IS-97 mittels EDX	47
Abbildung 24: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS109-2) mittels ESI.....	48
Abbildung 25: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit QDots (IS-111)	49
Abbildung 26: Tomogramm aus der Tiltserie von Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-98-2).....	50
Abbildung 27: CLSM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium im Zellversuch	51
Abbildung 28: CLSM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln ohne Gadolinium im Zellversuch	52
Abbildung 29: CLSM-Aufnahmen transfizierter MSCs mit Clathrin-15 inkubiert mit Polyharnstoffkapseln	53

Abbildung 30: CLSM-Aufnahmen transfizierter DCs mit Tubuli-C-18 inkubiert mit Polyharnstoffkapseln	54
Abbildung 31: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit Gadolinium (IS-109-2) im Zellversuch.....	55
Abbildung 32: TEM-Aufnahmen der Polyharnstoffkapseln mit QDots (IS-111-2) im Zellversuch	56
Abbildung 33: STEM-Aufnahmen von Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2) im Zellversuch	57
Abbildung 34: STEM- und TEM-Aufnahmen von Polyharnstoffkapseln mit Gd (IS-109-2) im Zellversuch.....	57
Abbildung 35: FACS®-Messung der Polyharnstoffkapseln	58
Abbildung 36: Zytotoxizitätstest der Polyharnstoffkapseln.....	59
Abbildung 37: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Antikörpern auf DEMA-Partikeln	61
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Anbindung des sekundären Gold-Antikörpers	62
Abbildung 39: TEM-Aufnahmen von unfunktionalisierten DEMA-Partikeln	63
Abbildung 40: TEM-Aufnahmen von mit Anti-CD63-Antikörpern funktionalisierten DEMA-Partikeln	64
Abbildung 41: TEM-Aufnahmen von mit Maus IgG funktionalisierten DEMA-Partikeln	65
Abbildung 42: STEM-Aufnahmen von DEMA-Partikeln mittels EDX.....	66
Abbildung 43: CLSM-Aufnahmen der DEMA-Partikel im Zellversuch innerhalb von MSCs.....	67
Abbildung 44: TEM-Aufnahmen der unfunktionalisierten DEMA-Partikel außerhalb und innerhalb von DCs	68
Abbildung 45: TEM-Aufnahmen der funktionalisierten DEMA-Partikel außerhalb und innerhalb von DCs.....	69
Abbildung 46: TEM-Aufnahmen der funktionalisierten DEMA-Partikel außerhalb und innerhalb von DCs.....	70
Abbildung 47: FACS®-Messungen der DEMA-Partikel	71
Abbildung 48: Zytotoxizitätstest der DEMA-Partikel	72
Abbildung 49: TEM-Aufnahmen von Nanohydrogelen (\varnothing 100 nm) mittels „Drop Casting“ und im Zellversuch...	74
Abbildung 50: TEM-Aufnahmen von HES-Kapseln eingebettet in 1% Trehalose mit 4% UA.....	76
Abbildung 51: TEM-Aufnahmen der HES-Kapseln im Zellversuch	77
Abbildung A: Zusammensetzung der Kapselhülle der Polyharnstoffkapseln.	86
Abbildung B: Strukturformel von Gadovist® (Gadobutrol).	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Plasmide aus Bakterienstämmen	11
Tabelle 2: Auflistung der gewählten Laserlinien der PMTs zur Anregung bzw. Detektion der Fluorophore	25
Tabelle 3: Charakterisierung der Polyharnstoffkapseln, DLS, Zetapotential und Feststoffgehalt	43
Tabelle A: Verwendete magnetische Polystyrolpartikel mit entsprechender Antikörperfunktionalisierung	87
Tabelle B: Verwendete Chemikalien mit Hersteller und Firmensitz.....	90
Tabelle C: Verwendete Medien und Seren mit Hersteller und Firmensitz für die entsprechenden Zelllinien.....	91
Tabelle D: Verwendete Antikörper mit Hersteller und Firmensitz	91
Tabelle E: Verwendete Materialien mit Hersteller und Firmensitz	94
Tabelle F: Verwendete Geräte mit Hersteller und Firmensitz.....	94
Tabelle G: Verwendete Software mit Hersteller und Version	95

Publikationen

KAPS, L., NUHN, L., ASLAM, M., BROSE, A., FOERSTER, F., ROSIGKEIT, S., **RENZ, P.**, HECK, R., KIM, Y. O., LIEBERWIRTH, I., SCHUPPAN, D. AND ZENTEL, R. (2015). In Vivo Gene-Silencing in Fibrotic Liver by siRNA-Loaded Cationic Nanohydrogel Particles. *Advanced Healthcare Materials* 4(18): 2809-2815.

RENZ, P., KOKKINOPOULOU, M., LANDFESTER, K. AND LIEBERWIRTH, I. (2016). Imaging of polymeric nanoparticles: Hard challenge for soft objects. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 10.1002/macp.201600246

TONIGOLD, M., ESTUPINAN, D., KINTZEL, U., KALTBEITZEL, A., **RENZ, P.**, LIEBERWIRTH, I., CRESPIY, D., LANDFESTER, K. AND MAILÄNDER, V. (2016). Targeting by the Protein Corona: PreadSORption of antibodies outperforms chemical coupling on nanocarriers. Submitted

WALD, S., TONIGOLD, M., LANGHANKI, J., KRUMB, M., **RENZ, P.**, SIMON, J., SAUER, C., LIEBERWIRTH, I., WURM, F. R., MAILÄNDER, V., LANDFESTER, K. AND OPATZ, T. (2016). Synthesis of clickable oligosaccharides. Submitted

Lebenslauf

Danksagung

Danksagung

Eidesstaatliche Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis August 2016 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere von Frau Prof. Dr. Katharina Landfester am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Kooperation mit dem Sonderforschungsbereich 1066 der Johannes-Gutenberg Universität Mainz erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Stellen, die im Sinn der Wortlaut aus anderen Arbeiten entnommen wurden, sind entsprechend kenntlich gemacht und durch Angabe von Quellen belegt.

Mainz, 29. August 2016

Patricia Renz