

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten  
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde  
des Universitätsklinikums der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Fluoreszenzmarkierte Nanogelee  
auf Poly(glycidol)-Basis –  
Herstellung, Charakterisierung  
und deren Interaktion *in vitro***

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Theresa Leonora Zipplies

aus Heidelberg

Würzburg, Juni 2017

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll  
Korreferentin: Prof. Dr. med. Franziska Jundt

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2018

Die Promovendin ist Zahnärztin.

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

**Inhalt**

Abkürzungsverzeichnis ..... iv

1 Einführung..... 1

2 Introduction ..... 5

3 Kenntnisstand ..... 8

    3.1 Nanotechnologie in der Medizin und Pharmazie ..... 8

    3.2 Nanohydrogele ..... 10

        3.2.1 Definition und Eigenschaften ..... 11

        3.2.2 Herstellungsverfahren..... 11

        3.2.3 Degradierbare und nicht degradierbare Systeme..... 16

    3.3 Charakterisierung von kolloidalen Systemen..... 20

        3.3.1 Dynamische Lichtstreuung..... 20

        3.3.2 Nanoparticle Tracking Analysis ..... 22

    3.4 Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen  
..... 24

        3.4.1 Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Bestandteilen des Blutes 25

        3.4.2 Maskierung der NP mit Proteinen ..... 30

        3.4.3 Zelluläre Aufnahmemechanismen..... 30

4 Material und Methoden ..... 37

    4.1 Material ..... 37

        4.1.1 Laborgeräte und Programmsoftware..... 37

        4.1.2 Reagenzien und Lösungen ..... 38

        4.1.3 Verbrauchsmaterialien ..... 41

        4.1.4 HeLa-Zelllinie..... 41

    4.2 Übersicht der synthetisierten Proben ..... 42

    4.3 Methoden..... 44

        4.3.1 Funktionalisierung von Polymeren ..... 44

        4.3.2 Nanopartikel-Herstellung in inverser Miniemulsion..... 49

        4.3.3 Charakterisierung der Nanopartikel ..... 55

        4.3.4 Bestimmung der Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen  
Bedingungen ..... 57

4.3.5 Wechselwirkung von redox-sensitiven Nanopartikeln mit Bovinem Serumalbumin .....	58
4.3.6 Untersuchungen zur Zellaufnahme redox-sensitiver Nanopartikel ...	60
5 Ergebnisse .....	63
5.1 Funktionalisierung von Polyglycidol-Thiomerer .....	63
5.1.1 Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680-Maleimid .....	63
5.1.2 Funktionalisierung mit Cy7-Maleimid .....	64
5.1.3 Funktionalisierung mit Cy5-Alkin .....	69
5.2 Partikelcharakterisierung .....	75
5.2.1 DLS - Dynamische Lichtstreuung .....	76
5.2.2 NTA - Nanoparticle Tracking Analysis .....	84
5.3 Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen .....	94
5.3.1 Größenverteilung .....	95
5.3.2 Konzentrationsbestimmung .....	98
5.4 Wechselwirkungen zwischen redox-sensitiven Nanopartikeln und Bovinem Serumalbumin .....	102
5.4.1 Protein-Adsorption an redox-sensitive Nanopartikel .....	103
5.5 Live-Cell-Mikroskopie .....	107
5.5.1 Tat- und AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel .....	108
5.5.2 AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel ohne Fusionsprotein .....	111
6 Diskussion .....	113
6.1 Vorteile des Einsatzes von Polyglycidolen vs. Polyethylenglycol zur Herstellung von funktionalisierten NP .....	113
6.2 Funktionalisierung von Polyglycidol-Thiomerer .....	114
6.2.1 Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680-Maleimid .....	116
6.2.2 Funktionalisierung mit Cy7-Maleimid .....	118
6.2.3 Funktionalisierung mit Cy5-Alkin .....	123
6.3 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel .....	128
6.3.1 Methodenvergleich von NTA und DLS .....	131
6.3.2 Größenverteilung bei unterschiedlichen Ausgangspolymeren .....	136
6.3.3 Größenverteilung markierter und unmarkierter Nanopartikel .....	137

6.3.3.4 Mit Fluorophor markierte, nicht redox-sensitive Nanopartikel (Michael-Addition).....	141
6.3.3.5 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung durch Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering) .....	142
6.3.3.6 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Partikelcharakterisierung durch Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)....	142
6.4 Stabilität von Nanopartikeln in biologischem Medium .....	143
6.4.1 Stabilität redox-sensitiver Nanopartikel .....	144
6.4.1.1 Veränderung der Größenverteilung der redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation .....	144
6.4.1.2 Konzentrationsveränderung der redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation .....	145
6.4.2 Stabilität der über eine Michael-Addition hergestellten Nanopartikel ..	147
6.4.2.1 Veränderung der Größenverteilung der nicht Stimuli-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation .....	147
6.4.2.2 Konzentrationsveränderung der nicht redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation .....	148
6.4.3 Ausblick .....	149
6.5 Wechselwirkungen von redox-sensitiven Nanopartikeln mit Bovinem Serumalbumin .....	150
6.5.1 Protein-Adsorption an redox-sensitive Nanopartikel .....	151
6.6 In Vitro-Fluoreszenz-Mikroskopie .....	153
6.6.1 Tat- und AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel .....	154
6.6.2 AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel ohne Fusionsprotein Tat .....	155
7 Zusammenfassung und Ausblick .....	156
8 Literaturverzeichnis .....	159
9 Abbildungsverzeichnis .....	163
Danksagung .....	167
Lebenslauf .....	169

## Abkürzungsverzeichnis

AF680	Alexa Fluor 680
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Charge-Coupled Device, ladungsgekoppeltes Bauteil
cp	Centipoise, Einheit der dynamischen Viskosität, 1 cp = 1 mPa*s
Cy 5-Alkin	Cyanin-Farbstoff, enthält eine Alkingruppe
Cy 7-Maleimid	Cyanin-Farbstoff, enthält eine Maleimidgruppe
DLS	Dynamic Light Scattering, Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbeccos´ s Modified Eagle´ s Medium
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal calf serum
MW	Molecular Weight, Molgewicht
MWCO	Molecular Weight Cutoff
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
NG	Nanogel
NP	Nanopartikel
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PBS	Phosphate bufferd saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung, versetzt mit Tween 20
PEGDA	Polyethylenglycol-Diacrylat
PEG	Polyethylenglycol
PG	Poly(glycidol)
PG <sub>EH</sub> -SH	Thiol-funktionalisiertes, esterhaltiges Polyglycidol
PG <sub>EF</sub> -SH	Thiol-funktionalisiertes, esterfreies Polyglycidol
PG- <i>stat</i> -AGE	Poly(glycidol)- <i>stat</i> -allyl-glycidyl-ether

## 1 Einführung

Der Fortschritt sowohl auf den Gebieten der Peptid- und Protein-Produktionstechnologien als auch in den Bereichen der synthetischen Replikation und Herstellung von Oligonucleotid-, RNA- und DNA-Molekülen hat in den vergangenen Jahren vermehrt zur Entwicklung potentieller Peptid-, Protein- und RNA-basierter Wirkstoffe für neue Behandlungsansätze in der Medizin geführt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten im Blutkreislauf, bedingt durch die schnelle enzymatische Eliminierung der Pharmaka aus dem Blutkreislauf, ist jedoch ein intelligentes pharmakokinetisches Design notwendig, damit die Peptid-, Protein- oder RNA-basierten Wirkstoffe das designierte Ziel-Gewebe ohne Verlust ihrer Struktur, ihrer Stabilität und ihrer physikochemischen Eigenschaften erreichen. Hierfür können spezielle Wirkstofftransportsysteme zum Einsatz kommen, welche die Pharmazeutika gezielt zum Einsatzort bringen und dabei vor vorzeitigem Abbau schützen.

Es gilt ein Wirkstofftransportsystem zu finden, welches den sensiblen Biomolekülen nicht nur Schutz vor frühzeitigem Abbau bietet, sondern auch möglichst keinen negativen Einfluss auf die jeweilige Struktur der zu befördernden Wirkstoffe hat. Des Weiteren sollten die Transportvehikel eine ausreichend große Ladekapazität besitzen, um die für den Transport einer entsprechenden Dosis von Protein- und Peptid- bzw. RNA-basierten Pharmazeutika benötigte Menge an Transportvehikeln möglichst gering zu halten und so überschießende Immunreaktionen bei Kontakt des biologischen Systems mit den Wirkstofftransportsystemen, die unter Umständen als Fremdkörper wahrgenommen werden können, zu vermeiden. Eine weitere wünschenswerte Eigenschaft eines solchen Transportsystems besteht in der Fähigkeit, einen gezielten Wirkstofftransport zu ermöglichen und gleichzeitig den unspezifischen Wirkstofftransport zu anderen Geweben einzuschränken. Der spezifische Wirkstofftransport bietet die Möglichkeit durch kontrollierte Wirkstoffabgabe im Zielgewebe Erkrankungen gezielt und weitestgehend ohne systemische

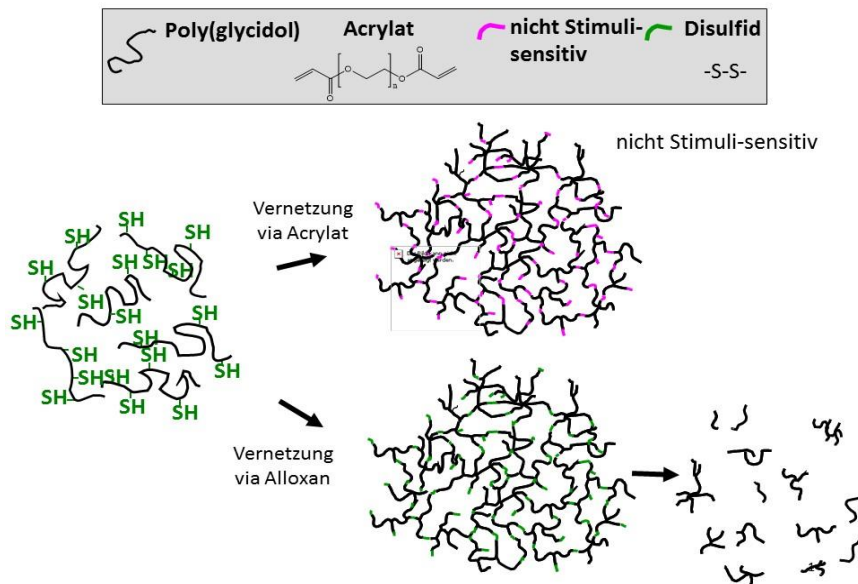


Nebenwirkungen zu behandeln. Wirkstofftransportsysteme mit dieser Eigenschaft werden bereits erfolgreich in der Tumor-Therapie eingesetzt. [1] [2]

Hydrophile vernetzte polymere Nanogele (NG) stellen für Pharmazeutika auf Protein-, Peptid-, RNA und Oligonucleotid-Basis potentielle Wirkstofftransportsysteme dar. Groll et al. haben in den letzten Jahren eine Methode zur Herstellung von NG durch oxidative Kupplung von synthetischen poly(glycidol)-basierten Thiomeren in inverser Miniemulsion entwickelt. [3] NG besitzen sowohl hydrogelartige Eigenschaften, welche unter anderem einen hohen Wassergehalt und Biokompatibilität beinhalten, als auch die Charakteristika von Nanopartikeln (NP), zu denen ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis und eine Größe, welche Wechselwirkungen mit Zellen ermöglicht, zählen. Die hydrophilen Polymernetzwerke weisen Größen im Sub-Mikrometer Bereich auf. Diese Eigenschaften ermöglichen die Einbindung von hydrophilen aber auch hydrophoben, biologisch aktiven Molekülen, welche durch die Partikel maskiert, gegen Abbau geschützt und in Zellen transportiert werden können. Die bei der NP-Synthese durch Oxidation der freien Thiole entstandenen Disulfidbrücken, welche die netzwerkartige Struktur der NG bedingen, können durch das ubiquitär in jeder Zelle vorkommende Glutathion wieder gespalten werden. So kann das Wirkstoffmolekül freigegeben werden. Zudem besteht die Option, die Oberfläche dieser NP mit Ziel-Molekülen zu modifizieren und so einen gezielten Wirkstofftransport zu ermöglichen.

Für den erfolgreichen Einsatz dieser NG als Transportvehikel ist es wichtig, NG reproduzierbarer Qualität und Quantität herzustellen und mögliche Wechselwirkungen mit biologischen Systemen zu kennen, damit ein gezielter und störungsfreier Wirkstofftransport gewährleistet werden kann.

In Abbildung 1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NG-Systeme schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanogel-Systeme

Ziele dieser Arbeit waren daher:

1. Herstellung fluoreszent markierter Präpolymere sowie deren Optimierung bezüglich der Farbstoffwahl und der Kopplungschemie;
2. reproduzierbare Synthese sowohl von redox-sensitiven als auch von nicht Stimuli-sensitiven NG mit und ohne Fluoreszenzmarkierung, die eine durchschnittliche Partikelgröße von 150 nm - 300 nm und Konzentrationen von  $> 10^{10}$  Partikeln/ml aufweisen;
3. Charakterisierung der synthetisierten NP bezüglich ihrer Partikelgröße und der Partikelkonzentration;
4. Untersuchung der Stabilität der NG unter physiologischen Bedingungen;
5. Untersuchung des Assoziationsverhaltens der synthetisierten NG mit Bovinem Serumalbumin (BSA);

6. Untersuchung des Aufnahmemechanismus der NG in die Zellen ohne Zellaufnahmeprotein und in Abhängigkeit mit dem mit der NP-Oberfläche assoziierten Zellaufnahmeprotein TAT.

## 2 Introduction

The progress in production-technologies for peptides and proteins, as well as in the fields of synthetic replication and synthesis of oligo-nucleotides, RNA molecules and DNA molecules has increasingly lead to the development of potential peptide-, protein- and RNA-based pharmaceutical drugs for new therapeutic approaches in medicine. Due to their short half lives, caused by the rapid enzymatic elimination from the blood circulation, an intelligent pharmacokinetic design is necessary, so that the peptide-, protein- or RNA-based drugs are able to reach their designated target tissue without losing their structure, their stability and their physicochemical properties. For this purpose specific drug delivery systems are used. Their function consists in bringing the pharmaceutical drugs to their designated site, while at the same time protecting them against premature degradation.

It is important to find a drug delivery system that provides *in vivo* protection from premature degradation for the sensitive biomolecules. In addition, the drug delivery system should not have any negative influence on the particular structure of the active ingredients to be transported. Furthermore, the transport vehicles should have a sufficiently large loading capacity to keep the number of vehicles required for the transport of a certain dose of protein-, peptide- or RNA-based pharmaceutical drugs as small as possible, so that excessive immune reactions upon contact of the biological system with drug-delivery systems, that possibly can be detected as a foreign body, may be minimized. A further desirable characteristic of such a transport system is the ability to enable a targeted drug delivery and at the same time restrict the non-specific drug delivery to other tissues. The specific drug delivery offers the possibility of controlled drug release at the target tissue. Thus, diseases can be treated specifically and largely without systemic side effects. Drug delivery systems with these characteristics are already used successfully in tumor therapy. <sup>[1]</sup> <sup>[2]</sup>

Hydrophilic crosslinked polymeric nanogels (NG) provide a potential drug delivery system for pharmaceuticals based on proteins, peptides, RNA and oligo-

nucleotides. In recent years Groll et al. have developed a method for the preparation of NG in inverse miniemulsion by oxidative coupling of synthetic poly(glycidol)-based thiomers. [3] NG possess both hydrogelic properties, which include a high water content and biocompatibility, as well as the characteristics of nanoparticles (NP), which include a high surface-to-volume ratio and a size, that allows interactions with cells. The hydrophilic polymer networks have sizes in the sub-micrometer range. These properties allow the integration of both hydrophilic as well as hydrophobic, biologically active molecules, which can be masked by the particles, concurrently protected against degradation and transported into cells. The disulfide bridges, which are the result of the oxidation of the free thiol functionalities during the process of NP synthesis and determine the network-like structure of NG, can be cleaved by glutathione, a molecule, which can be found ubiquitously in every cell. Thus, the pharmaceutical drug molecule can be released inside the cell. There exists also the option to modify the surface of the NP with target molecules, which enable a targeted drug delivery.

For the successful use of NG as transport vehicles, it is important to produce NG of reproducible quality and quantity. It is also necessary to know the potential interactions with biological systems, so that a specific and interference-free drug delivery can be guaranteed.

Figure 1 gives a short overview of the NG-systems used during the experimental phase of the presented work.

Objectives of this study were therefore:

1. Preparation of fluorescently labeled prepolymers and their optimization with respect to the selection of dye and coupling chemistry;
2. Reproducible synthesis of both redox-sensitive and non-stimuli-sensitive NG with and without fluorescent label, having an average particle size of 150 nm – 300 nm and having concentrations of  $> 10^{10}$  particles/ml;

3. Characterization of the synthesized NP with respect to their particle size and particle concentration;
4. Investigation of the stability of NG under physiological conditions;
5. Investigation of the association behavior of the synthesized NG with bovine serum albumin (BSA);
6. Investigation of the mechanism of cellular uptake of both NG, which are associated with the TAT-peptide that is able to facilitate the uptake into the cells, as well as NG without TAT-peptide.

### 3 Kenntnisstand

#### 3.1 Nanotechnologie in der Medizin und Pharmazie

Die Nanotechnologie umfasst alle Technologien, die sich mit Strukturen und Prozessen sowie mit der Herstellung von Materialien und Systemen auf der Nanometerskala beschäftigen. Es handelt sich um eine interdisziplinäre Technologie, mit der sich unter anderem Bereiche der Physik, Chemie, Biologie und Biotechnologie beschäftigen. Folglich bezeichnet die Nanotechnologie keine spezifische Technologie, sondern ein breit gefächertes Technologiefeld. <sup>[4]</sup> Nach einer Definition der British Standards Institution werden Partikel, die in einer oder mehr Dimensionen kleiner als 100 nm sind, als NP bezeichnet. <sup>[5]</sup> Der Terminus beinhaltet zum einen die natürlich vorkommenden und zum anderen die synthetisch hergestellten Partikel in einem Größenbereich unter 100 nm.

Seit Ende des 20. Jahrhunderts rückte in der Forschung weltweit die Synthese von NP für den medizinischen und pharmazeutischen Gebrauch in den Vordergrund. Insbesondere an der Entwicklung von NP als Wirkstofftransportsystem und für den Einsatz auf dem Gebiet des Tissue-Engineering wurde mit Hochdruck gearbeitet. <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup> Es gibt bereits eine Vielzahl an nanoskaligen Produkten, die für die klinische Anwendung zugelassen sind. <sup>[8]</sup> Zu diesen zählt beispielsweise Abraxane®. Dabei handelt es sich um ein Chemotherapeutikum, welches vor allem für die Therapie von Mamma-Karzinomen eingesetzt wird. In Abraxane® liegt der Wirkstoff Paclitaxel, ein natürlich vorkommendes Zytostatikum in einer an das Blutserumprotein Albumin gebundener Form vor (nab-Paclitaxel – Nanoparticle Albumine Bound Paclitaxel). Die durchschnittliche Größe dieser Protein-NP beträgt 130 nm. <sup>[2]</sup> Das Bestreben dieser Entwicklung ist es mit Hilfe der NP Wirkstoffe wie Medikamente oder Wachstumsfaktoren, aber auch Proteine, Nucleinsäuren oder Kontrastmittel gezielt in einem biologischen Organismus zum designierten Wirkungsort, bzw. zu bestimmten Zielzellen zu transportieren. Zum einen bieten die NP einen geschützten Wirkstofftransport, da sich der zu befördernde Wirkstoff abgeschirmt von äußeren Einflüssen im Inneren des NPs

befindet. Ein vorzeitiger Abbau des Wirkstoffes durch Enzyme oder Umweltfaktoren kann so verhindert und der Wirkstoff ungestört zur Zielzelle transportiert werden. [9]

Zum anderen ermöglicht die geringe Größe der NP neben dem Vordringen der Teilchen in sehr dünne Kapillaren auch die Zellaufnahme. Weiterhin kann eine kontinuierliche Wirkstoffabgabe im Zielgewebe über einen definierten Zeitraum hinweg eingestellt werden. [10]

Zu den Vorzügen der NP zählt auch der rasche Wirkungseintritt. Die mit Wirkstoff beladenen NP können direkt in den Blutkreislauf injiziert werden und somit unter Umgehung des Magen-Darm-Traktes, in dem der Wirkstoff zunächst resorbiert werden müsste, schneller an ihren Bestimmungsort gelangen.

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, erkranktes Gewebe gezielt behandeln zu können. Es existieren bereits zahlreiche Publikationen, die sich mit den Möglichkeiten der selektiven Tumortherapie mit Hilfe von Makromolekülen und NP beschäftigen. Grundlage für die selektive Tumortherapie ist die Beschaffenheit und Pathophysiologie des Tumorgewebes. Dieses zeichnet sich durch eine lockere Zellstruktur, Angiogenese und damit verbundene Hypervaskularisierung, Defekte im Endothel der Blutgefäße und eingeschränkten, zum Teil sogar fehlenden Lymphabfluss aus. Die Anreicherung von polymeren Makromolekülen und NP ist in erster Linie auf die Durchlässigkeit der Endothelzellschicht der Blutgefäße zurückzuführen. Während im gesunden Gewebe Makromoleküle nicht in der Lage sind die Endothelzellschicht zu durchdringen, ist im erkrankten Tumorgewebe das Endothel aufgelockert und fenestriert, so dass die NP die Gefäßwand durchdringen und in den Tumor diffundieren können. Zusätzlich hängt die vermehrte Anreicherung der Makromoleküle im Tumorgewebe auch mit der verminderten Lymphdrainage zusammen. Das beschriebene Ereignis der passiven Anreicherung von Makromolekülen und NP im Tumorgewebe wird auch als EPR-Effekt (engl. „enhanced permeability and retention“ – erhöhte Permeabilität und Retention) bezeichnet. Ein an NP gekoppeltes Chemotherapeutikum kann somit selektiv im Tumorgewebe konzentriert werden und nach seiner Abspaltung vom



Trägerobjekt in seiner freien Form wirken, wodurch der negative und zerstörerische Einfluss des Wirkstoffes auf gesundes Gewebe reduziert wird. <sup>[11]</sup>  
<sup>[12]</sup>

Der für die Tumorthherapie beschriebene Mechanismus wird auch als „Passives Targeting“ bezeichnet, da die mit den Therapeutika beladenen Partikel ohne spezifische Bindung über biologische Signale in die Zielzelle gelangen. <sup>[12]</sup>

Neben einem „Passiven Targeting“ existiert auch ein „Aktives Targeting“. Bei diesem zielen die NP und Makromoleküle auf einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle ab. Sie werden nach Aktivierung dieses Rezeptors von der Zelle aktiv aufgenommen oder verbleiben an den Rezeptor gebunden auf der Oberfläche der Zielzelle. Auch dieser Mechanismus kann für die spezifische Therapie von Geweben genutzt werden, solange ein Rezeptor als Angriffspunkt gewählt wird, der ausschließlich im Zielgewebe vorkommt. Dazu kann die Oberfläche der NP zusätzlich mit einer entsprechenden Erkennungssequenz dekoriert werden. <sup>[13]</sup>

Bei der Anwendung solcher Systeme muss jedoch eine mögliche Toxizität und Biounverträglichkeit ausgeschlossen werden. Zudem sollten Wechselwirkungen der nanoskaligen Trägersysteme mit Blutplasmaproteinen und eine damit verbundene Inaktivierung durch zum Beispiel Aggregatbildung, ein vorzeitiger Abbau durch Reduktion, Hydrolyse oder Enzyme oder aber eine frühzeitige Entfernung der NP aus dem Blutkreislauf durch renale Clearance oder das retikuloendotheliale System beachtet werden. <sup>[8]</sup> <sup>[13]</sup>

### **3.2 Nanohydrogele**

Unter den nanopartikulären Wirkstofftransportsystemen wird den Nanohydrogelen seit einigen Jahren eine große Rolle beigemessen. Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über Definition und Herstellungsmöglichkeiten von Nanohydrogelen geben und die verschiedenen NG-Systeme kurz erläutern.

### 3.2.1 Definition und Eigenschaften

Nanohydrogele sind physikalisch oder chemisch dreidimensional verknüpfte, in Wasser gequollene Netzwerke aus hydrophilen Polymerketten im nanoskaligen Bereich. [3] [13] [14] [15] [16] Zu ihren herausragenden Eigenschaften zählen Biokompatibilität, ein hoher Wasser-Gehalt, steuerbare chemische und mechanische Beschaffenheit sowie eine in Relation zu ihrer partikulären Netzwerkgröße große Oberfläche, das bedeutet ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis. [3] [15] Sie besitzen eine hohe Beladungseffizienz für pharmazeutische Wirkstoffe, DNA, siRNA oder Proteine und lassen sich von Faktoren wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur spezifisch beeinflussen. Nanohydrogele können Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen anbinden, ihnen eine geeignete hydrophile Umgebung bieten und sie durch sterische Hinderung vor einem Abbau schützen. [3] [7] [13] [17]

### 3.2.2 Herstellungsverfahren

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Syntheseverfahren zur Herstellung von NP. Diese basieren alle auf der Verknüpfung von Monomeren, Polymeren oder vopolymerisierten Präpolymeren. Bei den Polymeren handelt es sich um eine chemische Verbindung aus Ketten- oder verzweigten Molekülen, welche ein hohes Molekulargewicht besitzt und die sich aus identischen, sich wiederholenden Einheiten mit geringem Molekulargewicht, den sogenannten Monomeren, zusammensetzt. Präpolymere bestehen ebenfalls aus Monomeren, haben aber im Vergleich zu den Polymeren ein niedrigeres Molekulargewicht und können aufgrund ihrer reaktiven Gruppen weiter verknüpft werden. [18] [19] Die Synthesemethoden lassen sich in vier Gruppen unterteilen.

Zur ersten Gruppe gehört die Herstellung von NP durch physikalische Selbstassemblierung von Polymeren. Das Prinzip der physikalischen Selbstorganisation von amphiphilen Polymeren beruht auf der Tatsache, dass sich hydrophile, in Wasser lösliche Polymere über Interaktionen hydrophober

Polymer-Seitenketten oder elektrostatische Wechselwirkungen zusammen lagern und so NP bilden. Die Größe der so entstehenden NP kann durch das Variieren der Polymer-Konzentration und der Polymerlänge sowie der hydrophoben und hydrophilen Polymer-Anteile und die Veränderung der Umgebungsfaktoren, wie pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur, beeinflusst werden. <sup>[13]</sup>

Die zweite Gruppe beinhaltet die kovalente Quervernetzung von Polymerketten über Additions-Reaktionen oder radikalische Polymerisation. <sup>[15]</sup> Diese können, abhängig von verwendetem Polymer und Quervernetzer, in einer Öl-in-Wasser-Emulsion, einer Wasser-in-Öl-Emulsion oder aber in wässriger Lösung erfolgen. Bei den Cross-Linkern handelt es sich meist um bi- bzw. multifunktionelle Monomere oder Copolymere. <sup>[10] [13] [20]</sup>

Das Synthese-Verfahren der dritten Gruppe beruht auf der Verwendung einer Vorlage (Template). Bei diesem Verfahren, das auch den Namen „Photolithographic technique PRINT“ trägt, kommen elastomere Matrizen, die eine nicht benetzende Oberfläche besitzen, zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Matrizen werden aus einem flüssigen Vorläuferprodukt bekannter Zusammensetzung, welches sich auf einer ebenfalls nicht benetzenden Unterlage befindet, die NP „heraus gestempelt“. Die Verwendung einer vorgefertigten, nicht benetzenden Form und Unterlage ermöglicht die Herstellung monodisperser Partikel mit einer bestimmten, vorgegebenen Form, Größe und Zusammensetzung. <sup>[13] [21]</sup>

Die vierte Gruppe umfasst die NP-Synthese durch Polymerisation von Monomeren oder Präpolymeren in homogener Phase oder aber in einer heterogenen, kolloidalen Umgebung. <sup>[13]</sup> In diese Gruppe gehören unter anderem die Suspensionspolymerisation und die Emulsionspolymerisation. Sowohl bei der Suspensionspolymerisation als auch bei der Emulsionspolymerisation handelt es sich um Zweiphasensysteme.

Bei der Suspensionspolymerisation wird ein in Wasser unlösliches, hydrophobes Monomer durch Rühren in Wasser dispergiert. In der Folge bilden sich kleine Monomertröpfchen, in denen dann die Polymerisationsreaktion abläuft. Man bezeichnet daher auch die Monomertröpfchen als Reaktionsräume. Damit eine

radikalische Polymerisation im Monomertröpfchen gestartet werden kann, muss ein im Monomer löslicher Initiator verwendet werden. Zur Verhinderung der Sedimentation und des Verschmelzens von Monomertröpfchen ist es ratsam, Stabilisatoren, die der Herabsetzung der Grenzflächenspannung dienen, einzusetzen und die Suspension durch ständiges Rühren aufrecht zu erhalten. [22]

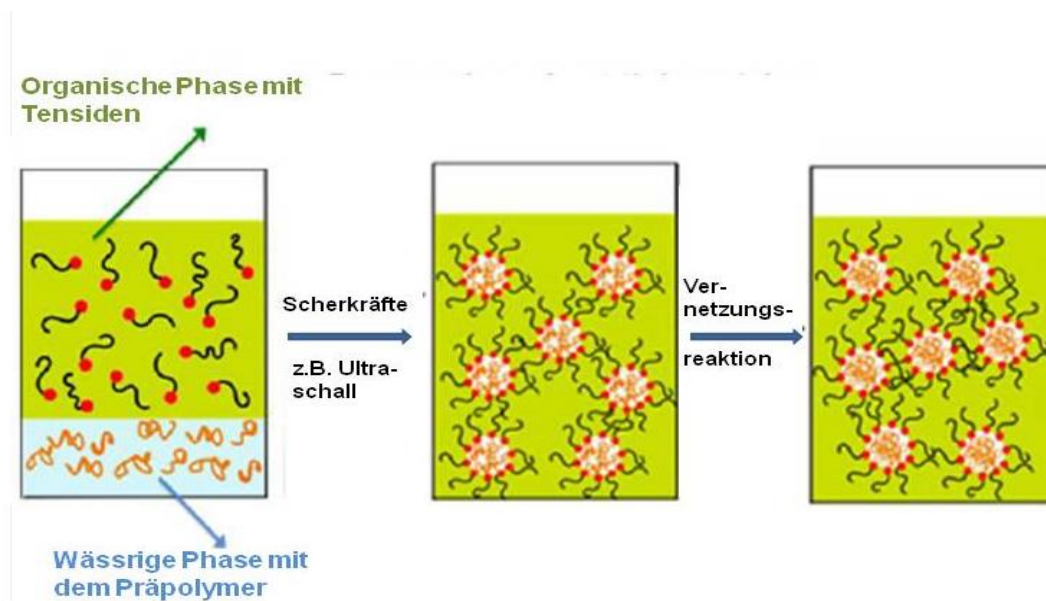
Bei der Emulsionspolymerisation findet die Polymerisation im Gegensatz zur Suspensionspolymerisation in der wässrigen Phase statt. Deshalb werden ein geringfügig wasserlösliches Monomer, welches durch Rühren in Wasser emulgiert wird, und ein wasserlöslicher Initiator benötigt. Um die entstandene Emulsion zu stabilisieren werden zusätzlich Tenside mit amphiphilen Eigenschaften hinzugefügt. Diese bilden Mizellen aus, in denen im weiteren Reaktionsverlauf die Polymerketten heranwachsen können.

Aufgrund der Tatsache, dass ein wasserlöslicher Initiator zur Anwendung kommt, setzt die Polymerisation in der wässrigen Phase ein. Es bilden sich Polymerradikale, welche durch weitere Anlagerung von Monomer immer hydrophober werden und schließlich in das hydrophobe Innere der Mizellen hinein diffundieren. Im Inneren der Mizellen wird die Polymerisation dann durch Anlagerung von Monomer, welches aus den Monomertröpfchen ebenfalls in das Mizell-Innere diffundiert, fortgeführt. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Anlagerung von Tensiden an ein Polymerradikal und somit die Entstehung einer Mizelle um ein vorhandenes Polymerteilchen herum. [23] [24]

Ein Spezialfall der Emulsionspolymerisation ist die inverse (Mini-) Emulsionspolymerisation, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat und auf die im folgenden Unterkapitel ausführlich eingegangen werden soll.

### 3.2.2.1 Inverse Miniemulsion

Die inverse Miniemulsion, bei der es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion handelt, wird dann angewendet, wenn das bei der NP-Synthese eingesetzte Präpolymer hydrophile Eigenschaften besitzt und gut wasserlöslich ist und somit die NP-Herstellung in direkter Miniemulsion nicht möglich ist. Das Verfahren birgt den Vorteil, dass wasserlösliche Partikel mit einer definierbaren Größe im Nanometerbereich ( $< 1 \mu\text{m}$ ) synthetisiert werden können. Im Vergleich dazu variiert die durchschnittliche Partikelgröße der dispergierten Partikel bei der (inversen) Emulsionspolymerisation stärker und bewegt sich in einem Größenbereich von 100 nm bis 100  $\mu\text{m}$ . [25]



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der NP-Synthese in inverser Miniemulsion; verändert nach Figure 2.4 aus der Dissertation von S. Singh [1]

Genau wie bei den oben beschriebenen Verfahren der Suspensions- und Emulsionspolymerisation wird auch bei der inversen Miniemulsionspolymerisation ein System aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen verwendet. Inverse Miniemulsionen, bei denen es sich um Wasser-in-Öl-Emulsionen handelt, bestehen zum großen Teil aus einer öligen Phase, zum Beispiel einem organischen Lösungsmittel, und einer wässrigen Phase. Die

wässrige Phase enthält in erster Linie ein hydrophiles Monomer oder auch Präpolymer, welches zu einem partikulären Netzwerk verknüpft werden soll, und einen wasserlöslichen Initiator oder ein wasserlösliches Oxidationsmittel. In der Öl-Phase sind Tenside enthalten, die unter anderem der Stabilisation der inversen Miniemulsion dienen, aber auch die Größe der Wassertröpfchen beeinflussen. Die Herstellung der inversen Miniemulsion erfolgt in zwei aufeinander folgenden Schritten. Ein erster Schritt beinhaltet das Rühren der beiden Phasen mit dem Ziel der Homogenisierung. Dadurch bilden sich kleine, durch Tenside im organischen Lösungsmittel stabilisierte Wassertropfen, die eine relativ breite Größenverteilung aufweisen. Die so entstandene Emulsion neigt aufgrund der breiten Größenverteilung der Wassertropfen jedoch dazu, sich nach geraumer Zeit erneut in die beiden Ausgangs-Phasen aufzutrennen. Die Ursache liegt in der sogenannten Ostwald-Reifung und der Koaleszenz begründet. Der Prozess der Ostwald-Reifung beruht auf der Tatsache, dass in kolloid-dispersen Systemen die kleineren Tröpfchen im Gegensatz zu den größeren einen höheren Dampfdruck aufweisen. Aufgrund des unterschiedlichen Dampfdrucks kommt es zur Diffusion der Moleküle von kleineren zu größeren Emulsionströpfchen, was zum Anwachsen der größeren auf Kosten der kleineren führt, bis letztere schließlich vollständig verschwinden. Koaleszenz bezeichnet das Zusammenfließen von zwei oder aber auch mehreren Emulsionströpfchen zu einem größeren. <sup>[25]</sup> Die zugesetzten Tenside stabilisieren zwar die Wassertröpfchen der inversen Miniemulsion gegen Ostwald-Reifung und Koaleszenz, können aber eine Phasentrennung langfristig nicht verhindern. Deswegen wird in einem zweiten Schritt das Zweiphasensystem starken Scherkräften ausgesetzt. Hierzu kann beispielsweise ein Ultraschallhorn verwendet werden. Der Einsatz starker Scherkräfte führt zu einem Verschmelzen und erneutem Aufspalten der vorhandenen Wassertröpfchen, was letztendlich in der Entstehung kleinster Wassertröpfchen mit einem Durchmesser im Bereich von 50 nm bis 500 nm und somit einer stabileren Emulsion resultiert. Neben der Dauer der Ultraschallanwendung hat auch die Menge des eingesetzten Tensids Einfluss auf die Größe der Wassertröpfchen. Diese dienen als räumliche

Begrenzung für die Vernetzungs-Reaktion, bei welcher die wasserlöslichen Präpolymere mit Hilfe eines ebenfalls wasserlöslichen Initiators zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft werden. [26] [27]

### **3.2.3 Degradierbare und nicht degradierbare Systeme**

NP lassen sich in degradierbare und in nicht degradierbare Systeme unterteilen. Degradierbare NP reagieren auf einen bestimmten externen Reiz mit dem Auflösen ihrer netzwerkartigen Struktur. Die nicht degradierbaren Systeme hingegen sollen äußeren Einflüssen standhalten können. Lediglich Wechselwirkungen mit Proteinen oder anderen Biomolekülen vermögen es die Struktur dieser NP zu verändern. Je länger sich die nicht degradierbaren NP in einem biologischen Organismus befinden, desto wahrscheinlicher ist es, dass sie durch diesen eliminiert werden. Mögliche Wechselwirkungen der NP mit Proteinen und anderen Biomolekülen führen zu einer Aggregatbildung bzw. zu einem Abbau dieser NP und somit letztendlich mittelfristig zu deren Funktionsverlust.

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Stimuli-sensitive, degradierbare Systeme erläutert. Hierbei wird das redox-sensitive System genauer beschrieben, da der Fokus der vorliegenden Arbeit in erster Linie auf der Untersuchung dieses Systems lag.

#### ***3.2.3.1 Stimuli-sensitive, degradierbare Systeme***

Den Stimuli-sensitiven NP kommt auf dem Gebiet der Biomedizin, vor allem im Bereich des kontrollierten Wirkstofftransports und der gezielten Freisetzung von Wirkstoffen, eine bedeutende Rolle zu. Sie ermöglichen den geschützten Transport und sind in der Lage auf einen spezifischen externen Reiz, zum Beispiel auf Temperatur, pH-Wert, Glucose oder andere Bio-Moleküle, Licht oder andere Umgebungskomponenten mit Veränderung ihrer Struktur oder

Degeneration zu reagieren und in der Folge den Wirkstoff am vorgesehenen Wirkungsort abzugeben. Abbildung 3 gibt einen ersten Überblick über die verschiedenen externen Stimuli, welche die kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung aus den entsprechenden Stimuli-sensitiven NP triggern können. [28] Im Anschluss werden einige der Stimuli-sensitiven Systeme im Detail vorgestellt.



**Abbildung 3:** Übersicht der Stimuli, die zu einer Strukturveränderung der NP und der damit verbundenen Freisetzung des Wirkstoffes führen können; verändert nach Priya James Honey et al., 2014, Figure 1 [28]

Die thermo-sensitiven Nanohydrogele zählen zu den gut untersuchten Wirkstofftransportsystemen und finden bereits breite Anwendung auf diesem Gebiet. Sie reagieren auf einen Temperaturwechsel mit einer reversiblen Sol-Gel-Umwandlung, was folglich die Freisetzung des biologisch aktiven Wirkstoffs initiiert. [28]



Das Prinzip der pH-sensitiven Systeme beruht auf dem Vorhandensein von sauren oder basischen, dissoziierbaren Gruppen, die abhängig vom pH-Wert in der Lage sind entweder ein Proton aufzunehmen oder ein Proton abzugeben. Bei den pH-sensitiven NP handelt es sich um Polyelektrolyte, die wiederum in schwache Polysäuren und schwache Polybasen unterteilt werden können. Während die anionischen Gruppen (Polysäuren) bei einem niedrigem pH-Wert protoniert sind und bei neutralem oder hohem pH-Wert Protonen abgeben, akzeptieren die kationischen Gruppen (Polybasen) Protonen bei einem hohen pH-Wert und geben bei vorliegendem niedrigen pH-Wert Protonen ab. Verändert sich der pH-Wert des umgebenden Milieus entsprechend, geben beispielsweise die Polysäuren ein Proton ab. Dies resultiert in der Entstehung eines negativ geladenen Polyelektrolyt-Anions und in der Änderung der Netto-Ladung des Moleküls. Die Änderung der Netto-Ladung führt zu einer veränderten Polymerstruktur, die wiederum die Freisetzung des Wirkstoffs begünstigt. [28]

Eine weitere Gruppe bilden die Systeme, die auf äußere Einflüsse, wie Licht, elektrische, magnetische oder elektromagnetische Felder mit einer Strukturänderung reagieren. Hier soll im Folgenden beispielhaft das Licht-sensitive System näher erläutert werden. Licht-sensitive NP sind in der Lage auf die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im sichtbaren oder im ultravioletten Bereich mit einer Gel-Sol-Umwandlung zu reagieren und so eine mögliche Wirkstoffladung freizugeben. Da die Wirkstofffreisetzung des eingeschlossenen Pharmazeutikums durch Bestrahlung räumlich (an einem bestimmten Wirkungsort) und zeitlich (zu einem gewählten Zeitpunkt) definiert erfolgen kann, zählen die Licht-sensitiven Systeme zu den vielversprechenden Wirkstofftransportsystemen. [28]

Neben den bisher beschriebenen Stimuli-sensitiven Systemen existiert die Gruppe der bio-reaktiven Systeme. Diese reagieren auf bestimmte Biomoleküle, die sich in einem biologischen Organismus befinden, mit Degradierung. Zu diesen bio-reaktiven Systemen zählen unter anderem Glucose-sensitive, Antigen-sensitive und Enzym-sensitive NP. [28] Aber auch die in dieser Arbeit

hauptsächlich verwendeten redox-sensitiven NP gehören zu der Gruppe der bio-reaktiven Systeme, da sich die Disulfidbrücken, welche die Verknüpfungspunkte des Polymer-Netzwerks darstellen, durch das im Cytosol ubiquitär vorkommende Glutathion reduzieren lassen, was letztendlich im Abbau der NP resultiert. Auf letzteres System soll im folgenden Unterkapitel detailliert eingegangen werden.

#### 3.2.3.1.1 Redox-sensitive Systeme

Unter den bio-reaktiven Systemen sind die redox-sensitiven NP-Systeme als potentielle Wirkstofftransportsysteme und für die intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes von besonderem Interesse. Dies ist in erster Linie auf die Tatsache, dass im Inneren der Zellen, dem Cytosol, reduzierende Biomoleküle in hoher Konzentration vorkommen, zurückzuführen. Redox-sensitive NP enthalten Disulfidbrücken, welche bei der oxidativen Quervernetzung der einzelnen thiol-funktionalisierten Präpolymer-Ketten zu einem dreidimensionalen Nanohydrogel-Netzwerk entstehen und sich durch ein reduzierendes Milieu wieder spalten lassen. Auf einen biologischen Organismus übertragen bedeutet dies: die redox-sensitiven NP sind, solange sie sich im Extrazellularraum befinden, stabil; sobald sie jedoch von einer Zelle aufgenommen werden, sorgt das im Cytosol in hoher Konzentration vorhandene Tripeptid Glutathion, welches eine freie Thiol-Gruppe enthält, für die Reduktion und somit die Spaltung der Disulfidbrücken in freie Thiol-Gruppen. Die Auflösung der Disulfidbrücken bringt auch die Freisetzung des Wirkstoffes mit sich. Allerdings kommt Glutathion, wenn auch in einer deutlich geringeren Konzentration, auch im Extrazellularraum vor. Die redox-sensitiven Systeme müssen also so stabil sein, dass sie auf das Vorhandensein geringer Glutathion-Mengen nicht reagieren. <sup>[29]</sup>

Wird der zu transportierende Wirkstoff zum Beispiel mit einem endständigen Cystein versehen, kann dieser über eine freie Thiol-Gruppe kovalent in das NG eingebunden werden und ist somit im Extrazellularraum vor Abbau geschützt. <sup>[16]</sup>

### 3.3 Charakterisierung von kolloidalen Systemen

Eines der etabliertesten Verfahren zur Charakterisierung von kolloidalen Systemen ist die Dynamische Lichtstreuung (DLS – Dynamic Light Scattering), welche die Bestimmung des hydrodynamischen Radius eines Partikels in Lösung ermöglicht. Bei der Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) hingegen handelt es sich um ein noch relativ neues Verfahren, mit dessen Hilfe die Partikelgröße, aber auch die Konzentration der Partikel bestimmt werden kann. Im Folgenden werden beide Methoden genauer beschrieben.

#### 3.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) zählt zu den etablierten und häufig verwendeten Methoden zur Bestimmung der Partikelgröße kolloid-disperser Systeme. Sie wird oft auch als Photonen-Korrelationsspektroskopie oder quasielastische Lichtstreuung bezeichnet.

Alle in einer Dispersion enthaltenen Teilchen unterliegen einer zufälligen, freien Diffusion, der Brown'schen Molekularbewegung. Die DLS ist in der Lage diese Molekularbewegung zu messen und daraus die Größe der Partikel abzuleiten. Zur Bestimmung der Brown'schen Molekularbewegung verwendet das Messverfahren die von kolloidalen Lösungen ausgehende Streuung des eingestrahlten Lichtes und die zeitabhängige Veränderung der Intensität der Streustrahlung.

Bei der DLS wird ein definiertes Probenvolumen mit einem Laser bestrahlt, woraufhin es zur Streuung des eingestrahlten Lichts an den Partikeln kommt, welche nachfolgend gemessen wird. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung kann eine destruktive bzw. konstruktive Interferenz des gestreuten Lichts gemäß dem physikalischen Doppler-Effekt beobachtet werden. Diese durch die Überlagerung des gestreuten Lichts entstandene zeitabhängige Fluktuation der Streuintensität wird detektiert. Mit Hilfe eines Korrelators wird die Intensität  $I(t)$  des Streulichts zu unterschiedlichen Zeitpunkten ( $t$  und  $t + \tau$ )

verglichen und eine Korrelationsfunktion aus den Intensitäten  $I(t)$  und  $I(t + \tau)$  errechnet. Die Autokorrelationsfunktion beschreibt die Diffusionsbewegung der dispergierten Partikel aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung und hat für monodisperse Partikel einen exponentiellen Verlauf.

Je kleiner die Partikel sind, desto schneller bewegen sie sich. Dadurch zeigt die Korrelationsfunktion bei kleinen Teilchen einen schnellen Abfall. Da die Autokorrelationsfunktion zeitabhängig ist, ermöglicht sie die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Die Partikelgröße wird schließlich mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten anhand der Stokes-Einstein-Gleichung (1) ermittelt. <sup>[30]</sup>

[31]

$$D = \frac{K_B \times T}{6\pi\eta d_h} \quad (1)$$

$D$ :	Diffusionskoeffizient
$K_B$ :	Boltzmann Konstante
$T$ :	Temperatur in Kelvin
$\eta$ :	Viskosität
$d_h$ :	Hydrodynamischer Durchmesser

Die Größenverteilung, die man zunächst als Ergebnis der DLS erhält, basiert auf der relativen Streuintensität des eingestrahlten Lichts, welches an den Partikeln unterschiedlicher Größe gestreut wird. Es handelt sich somit um eine Intensitätsgewichtete Größenverteilung. Dabei ist die Rayleigh-Streuung bzw. -Näherung zu beachten. Diese kommt zum Tragen, wenn die zu messenden Partikel verglichen mit der Wellenlänge des verwendeten Lasers deutlich kleiner sind. Sie besagt, dass die Intensität  $I$  des Streulichts proportional zur 6. Potenz des Partikeldurchmessers ist ( $I \sim d^6$ ). Das bedeutet, dass ein 50 nm großer Partikel

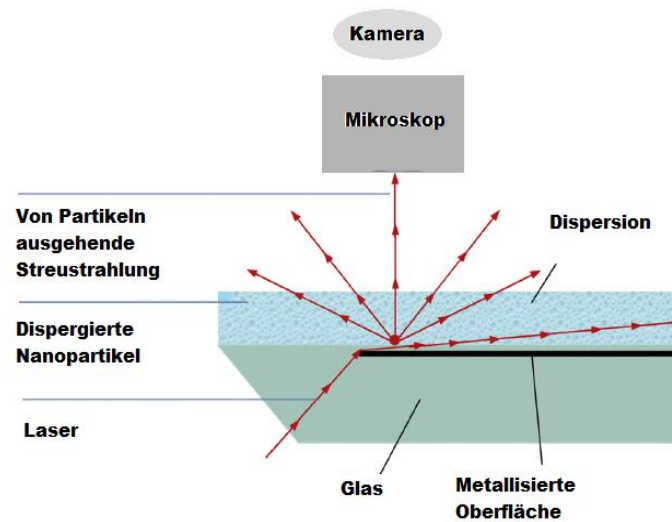
eine Millionen ( $10^6$ ) mal mehr Licht streut als ein 5 nm großer Partikel. Diese Tatsache ist wichtig für die Interpretation der Ergebnisse, da im Fall einer polydispersen Probe die Intensität des von den großen Partikeln ausgehenden Streulichts die Streuintensität der kleinen Partikel überlagert und die kleinen Partikeln bei der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung somit kaum ins Gewicht fallen. <sup>[30]</sup>

Polydisperse Proben können es also notwendig machen eine andere Art der Darstellung zu verwenden. So ist die DLS-Software in der Lage mit Hilfe der Mie-Theorie aus den Daten der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung eine Volumen-gewichtete Größenverteilung zu errechnen. Dabei gilt, dass das Volumen proportional zur 3. Potenz des halben Durchmessers (Radius) ist [ $V \sim (d/2)^3$ ].

Die DLS-Software ermöglicht neben der Kalkulation einer Volumen-gewichteten Größenverteilung auch die einer Anzahl-gewichteten Größenverteilung. Allerdings ist davon abzuraten, da ein Fehler hierbei nicht ausgeschlossen werden kann. <sup>[30] [32]</sup>

### 3.3.2 Nanoparticle Tracking Analysis

Wie bereits einführend erwähnt wurde, handelt es sich bei der Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) um eine relativ neue Methode, die 2006 erstmals auf dem Markt erschienen ist und eine Größen- und Konzentrationsbestimmung von kolloidalen Systemen möglich macht. Dieses Verfahren erlaubt es dispergierte NP mit einem Durchmesser von 30 nm bis ca. 1000 nm direkt und in Echt-Zeit zu visualisieren und zu charakterisieren. <sup>[33]</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des NTA-Aufbaus, verändert nach Dragovic et al., 2011, Figure 1. Abgebildet mit Erlaubnis. <sup>[34]</sup> Copyright 2011, Elsevier Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine.

Für die Visualisierung der in einer Probe enthaltenen NP wird ein Laser verwendet. Der Laserstrahl, der auf die in einer Messzelle befindliche Probe gerichtet ist, wird beim Auftreffen auf die Proben-Oberfläche gebrochen und der in die Probe eindringende Strahl beleuchtet die in der Probe dispergierten Partikel. Diese werden wiederum mit Hilfe einer CCD-Kamera, die auf einem Mikroskop platziert ist, detektiert. Die Kombination aus Mikroskop und Kamera bietet die Möglichkeit Videos des dynamischen Verhaltens der das Laserlicht streuenden Partikel aufzunehmen und diese Videos anschließend zu analysieren. Dabei stellt die NTA-Software einen Zusammenhang zwischen der Brown'schen Molekularbewegung dieser Partikel und deren Partikelgröße her. Die Software erkennt einzelne NP, verfolgt diese und misst deren Diffusionsstrecken. Die Berechnung der Partikelgröße (als hydrodynamischen Durchmesser) erfolgt anschließend anhand der bereits erwähnten Stokes-Einstein-Gleichung aus der ermittelten Geschwindigkeit der sich bewegenden Partikel. Da die Partikel lediglich in einer fokussierten Ebene detektiert werden, gilt  $\langle x, y \rangle$ . <sup>[33] [34] [35] [36]</sup>

$$\langle x, y \rangle^2 = \frac{K_B \times T_t}{3\pi n d_h} \quad (2)$$

$\langle x, y \rangle^2$ : mittlere quadratische Geschwindigkeit

$K_B$ : Boltzmann Konstante

$T$ : Temperatur in Kelvin

$t$ : Abtastzeit

$n$ : Viskosität

$d_h$ : Hydrodynamischer Durchmesser

Um eine genaue Charakterisierung vornehmen zu können, müssen die NP als einzelne Lichtpunkte sichtbar gemacht werden, welchen die NTA-Software folgen kann, da die Software nicht in der Lage die Brown'sche Molekularbewegung besonders großer Aggregate ( $> 1 \mu\text{m}$ ) oder Partikel mit Newtonschen Ringen zu verfolgen. Zur Erzielung optimaler Messergebnisse können Parameter der Video-Erfassung und auch der Video-Analyse manuell variiert werden. [34]

### 3.4 Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen

Eine der größten Herausforderungen bei der Verwendung von NP als potentielle Wirkstofftransportsysteme besteht darin die NP für den menschlichen bzw. tierischen Organismus möglichst kompatibel zu gestalten. Ziel ist es, dass die NP ungehindert und ohne negative Beeinträchtigung durch die diversen Bestandteile eines biologischen Systems an ihren Bestimmungsort gelangen. Allerdings sind Wechselwirkungen der NP mit den zahlreichen, in einem lebenden Organismus vorkommenden Komponenten nicht auszuschließen. Dies kann aber durchaus

auch wünschenswerte Vorteile, zum Beispiel die Maskierung von NP und damit verbundenen Schutz vor vorzeitigem Abbau, mit sich bringen.

Zu den Bestandteilen eines biologischen Systems zählen unter anderem Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und andere Biomoleküle. Die potentiellen Wechselwirkungen sind vielseitig und von verschiedenen Faktoren abhängig. So spielt neben den physikalischen und chemischen Eigenschaften der NP sowie der Biomoleküle zum Beispiel auch der pH-Wert des Umgebungs-Milieus eine Rolle. Interaktionen können unter anderem in Form von elektrostatischen Wechselwirkungen, kovalenten Bindungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen oder van-der-Waals-Kräften auftreten.<sup>[37]</sup> Aber auch die unterschiedlichen Zellaufnahmemechanismen spielen eine Rolle bei den NP-Organismus-Wechselwirkungen. Von allen möglichen Wechselwirkungen kommt den Protein-NP-Interaktionen eine besondere Bedeutung zu. Proteine machen einen Großteil eines jeden biologischen Organismus aus. Ihr Vorkommen ist ubiquitär. Deshalb soll in den folgenden Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 ausführlich auf die Wechselwirkungen von Proteinen mit NP eingegangen werden. Die daran anschließenden Abschnitte beschäftigen sich mit den zellulären Aufnahmemechanismen.

#### **3.4.1 Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Bestandteilen des Blutes**

Potenzielle Wechselwirkungen von NP mit Bestandteilen des Blutes sind für deren biomedizinische Anwendung *in vivo* von besonderer Bedeutung. Die NP gelangen beispielsweise durch intravenöse Injektion zunächst in den Blutkreislauf, über welchen sie schließlich zu ihrem Wirkungsort transportiert werden. Dabei spielt neben der Stabilität auch die Verweilzeit der NP im Blut eine große Rolle, was bei der Entwicklung von NP für den Einsatz als pharmazeutische Wirkstofftransportsysteme beachtet werden muss. Denn je länger die Partikel im Blutkreislauf zirkulieren, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das nanopartikuläre Wirkstofftransportsystem seine



Zielzellen erreicht, bevor es vom Organismus als Fremdkörper erkannt und durch Leber, Niere oder Milz eliminiert wird. [38]

Zudem sind die Wechselwirkungen von NP mit biologischen Materialien meist kompliziert, da Biomoleküle einen sehr heterogenen Aufbau, zum Beispiel unterschiedlichste Proteinstrukturen, aufweisen, so dass es schwierig ist die gesamte Breite der möglichen Wechselwirkungen zu berücksichtigen und genau zu untersuchen. Deshalb konzentriert sich die vorliegende Arbeit in erster Linie auf die Wechselwirkungen der NP mit Serumalbumin, dem Hauptbestandteil des Blutserums.

#### **3.4.1.1 Bestandteile des Blutes**

Blut ist eine Körperflüssigkeit, deren Gesamtmenge ca. 4,9 – 5,6 l beträgt. Betrachtet man die Zusammensetzung des Blutes, so kann es auch als „flüssiges Gewebe“ bezeichnet werden. Es besteht aus zellulären Bestandteilen, den Blutzellen, die in ihrer Gesamtheit auch als feste Blutbestandteile bezeichnet werden, sowie aus einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma, welches die Aufgabe der „Interzellulärsubstanz“ übernimmt. [39] [40] Tabelle 1 gibt einen kurzen, orientierenden Überblick über die einzelnen Blutbestandteile.

**Tabelle 1:** Übersicht über die festen und flüssigen Blutbestandteile

<b>Feste Blutbestandteile (ca. 42%)</b>	<b>Flüssige Blutbestandteile (ca. 58%)</b>
Erythrozyten	Wasser
Thrombozyten	Proteine (Albumin, Globuline, Gerinnungsfaktoren)
Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten)	Ausgangs- und Abbauprodukte (z.B. Nährstoffe, Vitamine, Hormone, Enzyme, Aminosäuren, Harnstoff)
	Elektrolyte (z.B. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> )

Zu den festen Blutbestandteilen zählen die Blutzellen, die sich wiederum in Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen) unterscheiden lassen.

Die Erythrozyten stellen unter den Blutzellen mit 4,5-5,5 Mio./ml den größten Anteil. Ihre Aufgabe liegt in erster Linie im Sauerstofftransport mit Hilfe ihres Hauptbestandteils Hämoglobin, aber sie sind auch am Kohlendioxid-Transport sowie an der Regulierung des pH-Werts beteiligt.

Die Thrombozyten sind mit einer Anzahl von 150 000 – 350 000 pro ml der zweithäufigste Blutzelltyp. Sie dienen der Blutstillung durch Thrombozytenadhäsion (Anheften an das die Verletzung umgebende Gewebe) und Thrombozytenaggregation. Dabei setzen sie Enzyme frei, welche schließlich die Blutgerinnung einleiten.

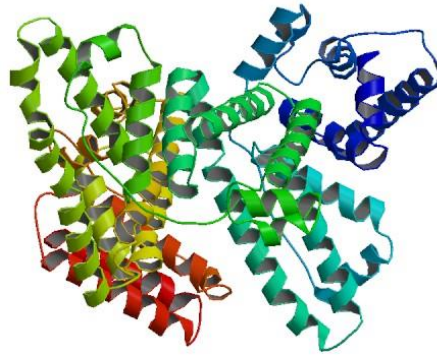
Die Leukozyten stellen zahlenmäßig den geringsten Anteil unter den Blutzellen. Sie bilden keine einheitliche Gruppe, sondern lassen sich unterteilen in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten, wobei sich die Granulo- und die Lymphozyten wiederum weiter kategorisieren lassen. Sowohl die angeborene als auch in Zusammenarbeit mit dem lymphatischen System die erworbene Immunabwehr zählen zu den Aufgaben der weißen Blutkörperchen. [39] [40] [41]

Der flüssige Bestandteil des Blutes, das Blutplasma, besteht zu 90% aus Wasser. Darin befinden sich unter anderem 6 – 8 % kolloidal gelöste Proteine, die sich in drei Untergruppen einteilen lassen: 4 – 5 % Albumine, 2 – 3 % Globuline ( $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline) und Gerinnungsfaktoren. Auch im Wasser gelöste Stoffwechselprodukte (2%), z. B. Nährstoffe (Glucose), Vitamine, Spurenelemente, Hormone, Enzyme, Aminosäuren, Kreatinin, Harnstoff uvm., sowie 1 % dissoziierte Salze ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  etc.) zählen zu den flüssigen Blutbestandteilen. Das Blutplasma erfüllt eine Vielzahl an Funktionen. Zu diesen gehören beispielsweise die Erzeugung des osmotischen Drucks, der Transport von Hormonen, Arzneimitteln und Nährstoffen, die Blutgerinnung, die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Werts (Pufferfunktion) sowie die

Nährfunktion. Entzieht man dem Blutplasma die Gerinnungsfaktoren, erhält man das Blutserum. [39] [40]

Von allen festen und flüssigen Blutbestandteilen kommt dem Protein Albumin, neben Wasser der Hauptbestandteil des Blutserums, bei den Interaktionen von NP mit Blutbestandteilen die größte Bedeutung zu.

Humanes Serum-Albumin (HSA, Abbildung 5) ist ein negativ geladenes, globuläres Plasma-Protein, welches überwiegend in der Leber synthetisiert wird. Seine Serum-Konzentration beträgt 35-50 mg/ml. Damit macht Albumin 60 % des im Serum befindlichen Gesamt-Proteins aus. Das Albumin-Molekül, dessen Molekülmasse ca. 66 kDa beträgt, besteht aus 585 Aminosäuren. Es enthält eine große Anzahl polarer und geladener Aminosäure-Reste, die für die hohe Wasserlöslichkeit des Albumins verantwortlich sind, sowie 35 schwefelhaltige Cystein-Reste. 34 dieser Cystein-Reste bilden insgesamt 17 Disulfidbrücken aus, welche die herzförmige Tertiärstruktur stabilisieren. In Lösung liegt HSA allerdings in ellipsoider Form vor. Aufgrund des einen nicht an der Formation der Disulfidbrücken beteiligten Cystein-Rests (Cys-34) enthält HSA eine freie SH-Gruppe, die redoxaktiv und in der Lage ist, mit anderen Molekülen zu reagieren. Bei physiologischem Blut-pH-Wert liegt das Albumin-Molekül überwiegend in reduzierter Form mit freier SH-Gruppe vor, ein kleinerer Anteil bildet jedoch Disulfidbrücken mit den im Serum enthaltenen niedermolekularen, thiolhaltigen Stoffen aus. [42] [43] [44] [45]



**Abbildung 5:** Humanes Serumalbumin (HSA) – Darstellung der Sekundärstruktur nach Sugio et al. (1999) <sup>[46]</sup> aus der RCSB Protein Data Base [www.pdb.org](http://www.pdb.org), Identifikationscode PDB ID 1AO6

Die Aufgaben von Albumin sind vielfältig. Zu diesen zählen beispielsweise die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und die Pufferfunktion. Außerdem besitzt Albumin eine große Anzahl an Bindungsstellen für verschiedene Moleküle wie Medikamente, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte etc., was es zu einem ausgezeichneten Transportvehikel für diese Stoffe macht. <sup>[44]</sup>  
<sup>[47]</sup> <sup>[48]</sup>

Auch in anderen Säugetierorganismen ist Serumalbumin das Plasmaprotein mit der höchsten Blutplasmakonzentration. Dabei finden sich Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz verschiedener Tierarten. So korrespondiert die Abfolge der Aminosäuren des Humanen Serumalbumins mit der des Bovinen Serumalbumins (BSA) in 75,6%. BSA enthält, genau wie HSA, 17 Disulfidbrücken und eine freie Thiol-Gruppe am Cysteinrest-34, was die strukturelle Ähnlichkeit beider Moleküle zur Folge hat. <sup>[48]</sup> Aufgrund der vergleichbaren Struktur der beiden Proteine sind orientierende Untersuchungen zur Protein-Adsorption mit BSA möglich und aussagekräftig.

### 3.4.2 Maskierung der NP mit Proteinen

Intravenös applizierte NP kommen in den direkten Kontakt mit den zahlreichen im Blut vorkommenden Biomolekülen. Dabei muss vor allem den Wechselwirkungen mit den Blutplasmaproteinen besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

In der Literatur ist belegt, dass eine (NP-)Oberfläche, sobald sie mit einem physiologischen Medium in Berührung kommt, von Proteinen bedeckt bzw. eingehüllt wird. Dieser Vorgang wird auch als Protein-Adsorption oder Bildung einer Proteinkorona bezeichnet. Die adsorbierten Proteine sorgen für neue Oberflächeneigenschaften, somit entsteht eine komplett veränderte NP-Oberfläche, welche mit den Plasmamembranen der Zellen interagiert, Einfluss auf die Biodistribution, die Zellaufnahme, den Transport und die Zirkulationszeit der NP im Blutkreislauf sowie auf deren Toxizität hat. Die NP bekommen durch die Proteinkorona eine Art neue biologische Identität, welche sehr variabel ist. [49]

[50] [51]

### 3.4.3 Zelluläre Aufnahmemechanismen

Jede Zelle wird von einer Zell- oder Plasmamembran umgeben, die das Zytosol von der extrazellulären Matrix trennt und der Zelle Schutz bietet. Zu den Hauptbestandteilen der Plasmamembran zählen amphiphile Lipide, deren hydrophobe Anteile sich zusammen lagern und so eine Lipiddoppelschicht bilden, Proteine, welche teilweise in die Lipiddoppelschicht eingelagert (integrale, membrandurchdringende Proteine) und teilweise lediglich extrazellulär mit der Membran assoziiert (periphere, membranassoziierte Proteine) sind sowie extrazellulär gebundene Kohlenhydratreste. [52] [53]

Die Plasmamembran besitzt vielfältige Aufgaben und Funktionen, die im Folgenden nicht weiter erläutert werden. Lediglich die Aufgabe des Transmembrantransports wird genauer beleuchtet, da dieser für die vorliegende Arbeit von größter Relevanz ist. In der Regel sind nur kleine ungeladene Moleküle wie Wasser oder lipophile Substanzen in der Lage die Lipiddoppelschicht durch

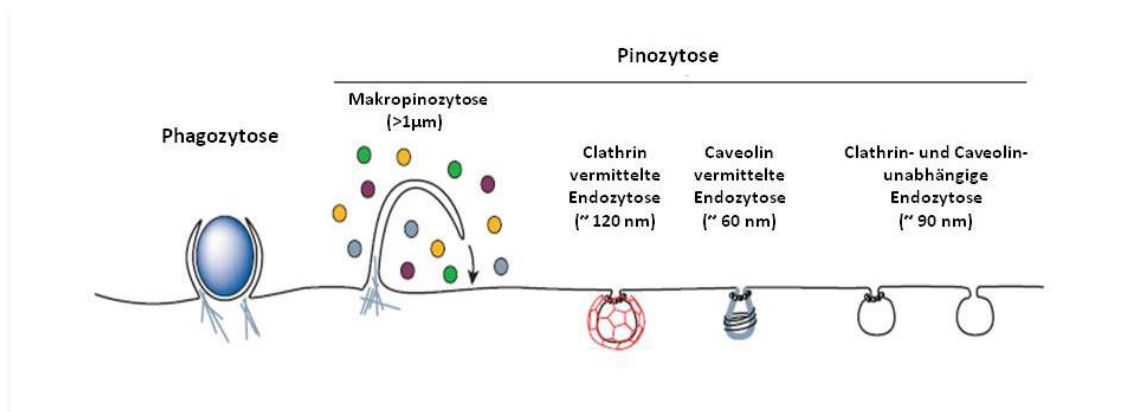
Diffusion zu überwinden. Für Ionen und alle anderen geladenen oder hydrophilen Moleküle stellt die Plasmamembran ein unüberwindbares Hindernis dar. Dieser Tatsache wird mit Hilfe von speziellen Transportmechanismen Abhilfe geschaffen. So werden beispielsweise Ionen und kleine Moleküle wie Zucker, Salze und Aminosäuren entweder passiv durch erleichterte Diffusion mit Hilfe von membrandurchspannenden Kanal- und Transportproteinen oder aktiv unter Energieverbrauch mit der Hilfe von integralen Transport-ATPasen über die Zellmembran hinweg befördert. <sup>[53]</sup> Eine weitere Möglichkeit des Transmembrantransports ist der Transport mit Hilfe von Membranvesikeln, der unter dem Begriff „Endozytose“ zusammengefasst werden kann. Durch Endozytose können unter anderem auch Makromoleküle aufgenommen werden, die dem Transmembrantransport mittels Transportproteinen aufgrund ihrer Größe nicht zugänglich sind.

Die folgenden Unterkapitel sollen den Begriff der Endozytose erläutern und einen Überblick über die zahlreichen Endozytosemechanismen geben.

#### **3.4.3.1 Endozytose**

Als Endozytose wird ganz allgemein das Internalisieren von Flüssigkeiten und kleinen Molekülen bis hin zu größeren Partikeln und in manchen Fällen sogar Zellen bezeichnet. Dabei stülpt sich ein kleiner Teil der Plasmamembran zunächst ein und umfasst die Materie, die aufgenommen werden soll, um sich dann anschließend nach innen abzuschnüren und so ein intrazelluläres Endozytosevesikel zu formen.

Es existieren zwei Hauptkategorien, in die die Endozytose nach der Größe der gebildeten Vesikel unterteilt werden kann: Die Pinozytose („Zell-Trinken“) beinhaltet das Einverleiben von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen und Molekülen mittels kleiner pinozytotischer Vesikel (ca. 100 nm). Unter Phagozytose („Zell-Fressen“, von altgriechisch phagein „fressen“) versteht man das Aufnehmen größerer Teilchen, wie zum Beispiel abgestorbener Zellreste und Mikroorganismen, über große Vesikel (> 250 nm), die auch als Phagosomen bezeichnet werden. <sup>[54] [55]</sup>



**Abbildung 6:** Verschiedene Formen der Endozytose am Beispiel einer Säugerzelle. Die Art und Weise, wie das Material aufgenommen wird, ist abhängig von der Größe des endozytotischen Vesikels, der Natur des aufzunehmenden Materials und dem Mechanismus der Vesikelbildung; verändert nach Conner und Schmid, 2003, Figure 1. Abgebildet mit Erlaubnis. <sup>[54]</sup> Copyright 2003, Nature Publishing Group, Nature.

Alle eukaryotischen Zellen (besitzen einen Zellkern) sind dazu in der Lage Flüssigkeiten und die darin gelösten Stoffe sowie kleine Moleküle via Pinozytose zu ingestieren. Große Partikel hingegen werden überwiegend von spezialisierten Zellen, den Phagozyten (Fress-Zellen), aufgenommen. <sup>[55]</sup>

Die Pinozytose ist ein Vorgang, der sich in allen eukaryotischen Zellen beobachten lässt. Dabei werden kleine Anteile der Plasmamembran, die ein bestimmtes Volumen extrazellulärer Flüssigkeit zusammen mit den darin gelösten Stoffen umschließen und so winzige endozytotische Vesikel formen, in die Zelle aufgenommen. <sup>[56]</sup> Es handelt sich um einen fortwährenden Prozess, der nicht unbedingt durch einen Reiz ausgelöst werden muss. <sup>[57]</sup> Die Pinozytose kann weiter in verschiedene Unterformen unterteilt werden: 1) Makropinozytose, 2) Clathrin-vermittelte Endozytose, 3) Endozytose über Caveolae und 4) Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose. Während die Pinozytose in einigen Fällen ein willkürliches Ereignis ist, da in der Flüssigkeit gelöste Substanzen ohne das Mitwirken von Rezeptoren wahllos aufgenommen werden, und somit die Menge der internalisierten Substanzen direkt abhängig von der Konzentration in der Flüssigkeit ist, lässt sich in anderen Fällen die Effizienz der Endozytose deutlich steigern, indem die gelösten Stoffe unspezifisch an die Plasmamembran

der Zelle (Adsorptive Pinozytose) oder gar spezifisch an Rezeptoren auf der Oberfläche der Plasmamembran binden (Rezeptor-vermittelte Endozytose).<sup>[54]</sup> Die Art und Weise, auf welchem Pinozytose-Weg ein Molekül in die Zelle gelangt, ist abhängig vom Molekül selbst und dem Rezeptor, den es aktiviert.<sup>[54]</sup>

Die Makropinozytose ist eine unspezifische, nicht-selektive Form der Pinozytose, die durch die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit und den darin enthaltenen Makromolekülen über die recht großen Makropinosome ( $> 0,2 \mu\text{m}$ ) charakterisiert ist.<sup>[58]</sup> Makropinosome entstehen meist aus schmalen Plasmamembran-Ausstülpungen heraus, die auch als Pseudopodien bezeichnet werden. Wenn nun eine Ausstülpung mit einer anderen verschmilzt oder zur Plasmamembran umklappt, wird dabei Extrazellulärflüssigkeit eingefangen und es formt sich ein großes endozytotisches Vesikel.<sup>[59] [60] [61] [62] [63]</sup>

Eine weitere Form der Pinozytose ist die Clathrin-vermittelte Endozytose, die auch zu den Rezeptor-vermittelten Endozytosen gezählt wird. Sie dient in erster Linie der Aufnahme von Nährstoffen, besitzt aber ebenfalls wichtige Funktionen im Bereich der Zellkommunikation und Zellhomöostase, da sie unter anderem auch an der Regulierung der Internalisierung von Transportproteinen, Ionenkanälen und Membranpumpen beteiligt ist.<sup>[54]</sup> Die Clathrin-vermittelte Endozytose nimmt ihren Ursprung an determinierten, mit dem Membranprotein Clathrin bedeckten Vertiefungen in der Plasmamembran, den sogenannten *Clathrin-coated pits*, die etwa 2 % der Gesamtoberfläche der Plasmamembran einnehmen und sich im weiteren Verlauf zu Clathrin-bedeckten Vesikeln (ca. 120 nm) entwickeln.<sup>[55] [56] [63]</sup>

Mit Hilfe der Endozytose über Caveolae wird ein Großteil der Plasmamembran recycelt und fast 70% des Flüssigkeitsvolumens aufgenommen. Als Caveolae werden 50-60 nm große flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran bezeichnet. Dabei handelt es sich um Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Membrandomänen, denen das Membranprotein Caveolin, welches an Cholesterol bindet, die typische Form verleiht. Die Caveolin-vermittelte Endozytose wurde für eine Vielzahl von Zellen beschrieben. Die Abschnürung



der Caveolae nach intrazellulär erfolgt unter Beteiligung von Aktin und Dynamin, wobei der exakte Mechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Aktuell existieren zwei Theorien:

- 1) Es handelt sich nicht um eine Endozytose, sondern um eine Potozytose, bei der die Caveolae nur vorübergehend schließen und ihren Inhalt ins Zellinnere entleeren, ohne sich von der Plasmamembran abzuschneiden.
- 2) Es handelt sich um einen Endozytosemechanismus ähnlich dem der Clathrin-abhängigen Endozytose, bei dem sich die Vesikel ins Zellinnere abschneiden.

Folsäure, Lipide und Proteine wie Albumin sowie Pathogene werden Caveolin-vermittelt aufgenommen. <sup>[54]</sup> <sup>[64]</sup> <sup>[65]</sup>

#### **3.4.3.2 Zelluläre Aufnahmen von Partikeln über die Tat-Proteinsequenz**

Eine Möglichkeit NP aktiv über die Plasmamembran hinweg in das Innere einer Zelle aufzunehmen ist die Anbindung von zellpenetrierenden Peptiden (cell-penetrating peptide = CPP) oder Proteintransduktionsdomänen an die NP. Zu diesen zählt unter anderem auch die Tat-Sequenz des Tat- (Transkriptions-aktivierenden) Proteins des humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1). Bereits in einer im Jahr 1988 von Frankel und Pablo durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Tat-Protein in der Lage ist, sowohl die Zellmembran als auch die Hülle des Zellkerns zu überwinden und in das Innere des Zellkerns zu gelangen. <sup>[66]</sup> Beim Tat-Protein handelt es sich um ein kleines nukleäres Protein, welches aus 86 Aminosäuren besteht und einen stark basischen Bereich mit 6 Argininen und 2 Lysininen enthält. <sup>[66]</sup> Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass der erwähnte basische Bereich entscheidend an der zellulären Aufnahme und Lokalisierung im Zellkern beteiligt ist. <sup>[67]</sup> <sup>[68]</sup> Basierend auf diesem Wissen wurde schließlich eine kürzere Sequenz, die Tat-Protein-Sequenz oder auch das Tat-Peptid, abgeleitet.

Das aus 11 hauptsächlich basischen Aminosäuren (6 Argininen und 2 Lysininen) bestehende Tat-Peptid (RKKRRQRRR), welches in der Lage ist Biomoleküle wie

Proteine und DNA sowie NP ins Zellinnere einzuschleusen, gehört zu den kationischen zellpenetrierenden Peptiden, die unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung aufweisen. <sup>[67]</sup> <sup>[69]</sup> Der genaue Mechanismus, der der Internalisierung mit Hilfe des Tat-Peptids zu Grunde liegt, konnte bis heute nicht zufrieden stellend geklärt werden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Frühe Studien legen einen Temperatur-, Energie- und Rezeptor-unabhängigen Prozess der Zellaufnahme nahe, da selbst bei einer Temperatur von 4°C, bei der üblicherweise alle in einer Zelle ablaufenden Prozesse inklusive Endozytose angehalten sind, die Aufnahme des Tat-Peptids nachgewiesen werden konnte. <sup>[68]</sup> In späteren Untersuchungen wurden die früheren Studien allerdings in Frage gestellt, da deren Ergebnisse nicht eindeutig reproduziert werden konnten. Vielmehr befürworten neuere Untersuchungen, dass es sich bei den Ergebnissen früher Studien um fehlerhafte, falsch positive Resultate handelt, da die analysierten Zellen unter anderem nicht ausreichend gewaschen worden seien. Es gilt als sicher, dass das positiv geladene Tat-Peptid an die negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykane der Zellmembran bindet. Bei dieser Art der Bindung handelt es sich um elektrostatische Wechselwirkungen, die auch bei Temperaturen unter 4°C auftreten. Werden nun zu untersuchende Zellen mit Tat-Peptid inkubiert, muss vor einer aussagekräftigen Messung ein Waschgang erfolgen, in welchem ungebundenes und lediglich extrazellulär an die Zellmembran gebundenes Tat-Peptid entfernt wird. <sup>[67]</sup> <sup>[69]</sup> <sup>[70]</sup>

Die neuesten Untersuchungsergebnisse lassen nunmehr auf energie- und temperaturabhängige Endozytose-Mechanismen schließen. Unter diesen scheint insbesondere die Makropinozytose, eine spezielle Form der Rezeptor-unabhängigen Endozytose, für die Tat-Peptid-vermittelte Aufnahme von Biomolekülen und NP von großer Relevanz zu sein. Zunächst bindet das positiv geladene Tat-Peptid über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Proteoglykane der Plasmamembran der Zelle. Im nächsten Schritt wird dann die Makropinozytose eingeleitet, welche die Aufnahme von sowohl

Membran-gebundenem als auch von in der Extrazellulärflüssigkeit vorhandenem Tat-Peptid mit sich bringt. Auf welche Art und Weise die Makropinozytose angestoßen wird, konnte allerdings nicht geklärt werden. <sup>[69]</sup> Aber auch andere Endozytose-Mechanismen, zum Beispiel die Clathrin- und Caveolin-vermittelte Endozytose, scheinen durchaus denkbar zu sein. <sup>[67]</sup> <sup>[71]</sup> Ebenso kann eine Aufnahme des durch elektrostatische Wechselwirkungen fest an die Plasmamembran gebundenen Tat-Peptids durch Plasmamembran-Recycling nicht ausgeschlossen werden. <sup>[67]</sup>

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Laborgeräte und Programmsoftware

**Tabelle 2:** Geräte und Software

Gerät/Software	Vertrieb
60x Ölimmersionsobjektiv UPlanSApo 60XO	Olympus America Inc. USA
Analysewaage Explorer	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Systec, Wetztenberg
ChemBioDraw Ultra 12.0	Perkin Elmer Informatics, Waltham, MA, USA
Dynamic Light Scattering – PSS Nicomp 380	Particle Sizing Systems, Santa Barbara, California
FCS – Bandpassfilter 675DF50	Omega Optics, Brattleboro, VT, USA
FCS – Diodenlaser (Cube)	Coherent, Oregon, USA
FCS – Immersionsobjektiv Plan Apochromat, 63x, NA 1.4	Zeiss, Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD	Christ, Osterode am Harz
Genesys 10S UV-Vis- Spectrophotometer	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Laborzentrifuge Sigma 3-16 KL	Sigma, Osterode am Harz
Magnetrührplatten	IKA Werke, Staufen
Mikrozentrifuge Mini Star	VWR International, Darmstadt
NTA	Nanosight, Amesbury, UK
OriginPro 9G	OriginLab Cooperation,
pH-Meter	WTW, Weilheim
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Reinstwasseranlage arium pro ®	Sartorius, Göttingen
Sonifier Digital 250 Cell Disruptor, Mikrospitze, konisch, 5mm	Branson, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Ultraschall-Wasserbad	Bandelin, Berlin
UV-Laser-Cubes	Polymerschmiede GmbH, Aachen

Gerät/Software	Vertrieb
Vortex Thermolyne Maxi Mix II	MG Scientific, Wisconsin, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Weitfeld-Mikroskop Olympus IX71 für Fluoreszenz-Mikroskopie	Olympus America Inc. USA

#### 4.1.2 Reagenzien und Lösungen

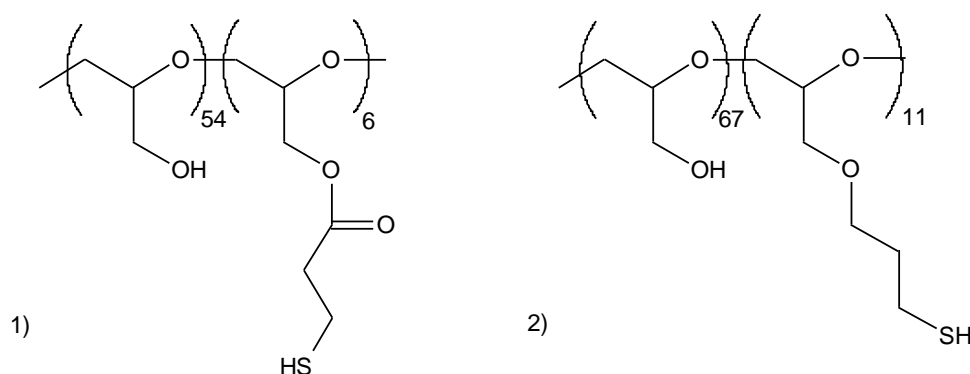
**Tabelle 3:** Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Lieferant
Alexa Fluor680-maleimide	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alloxan Monohydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cy5-alkyne	Lumiprobe GmbH, Hannover
Cy5-NHS-ester	Lumiprobe GmbH, Hannover
Cy7-maleimide	Lumiprobe GmbH, Hannover
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
2-2-Dimethoxy-2Phenyl-acetophenon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO, extra pure)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethanol, absolute, reagent ISO, reagent Ph. Eur., ≥ 99,8% (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hexan, CHROMASOLV for HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hydroxy-ethylacrylat (HEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Reagenz/Lösung	Lieferant
PBS-Puffer, pH = 7,4	Eigene Herstellung, Theresa Zipplies
Phosphate Buffered Saline (PBS) powder, pH = 7,4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phosphat-Puffer, pH = 8,0	Eigene Herstellung, Theresa Zipplies
Polyethylenglycol-Diacrylat (PEGDA), MW = 575 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Poly(glycidol) <sub>53</sub> -stat-poly(allyl-glycidylether) <sub>7</sub> , MW = 4777,98 g/mol	Eigene Herstellung, Matthias Kuhlmann, nach Groll et al. [3]; Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg
Poly(glycidol), esterfrei, thiol-funktionalisiert (PG <sub>EF</sub> -SH [67 Glycidol-Einheiten : 11 SH-Einheiten]), MW = 6662,2 g/mol	Eigene Herstellung, Ilona Zilkowski; Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg
Poly(glycidol), thiol-funktionalisiert (PG <sub>EH</sub> -SH [54 Glycidol-Einheiten : 6 SH-Einheiten]), MW = 5510 g/mol	Eigene Herstellung, Ilona Zilkowski, Susanne Feineis, nach Groll et al. [3]; Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg
Span 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tat-Peptid, Cys-Modified HIV TAT sequence 49-57 (Cys-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-NH <sub>2</sub> )	Peptides International, Louisville, KY, USA
Tetrahydrofuran (THF), ACS stabilisiert mit BHT	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Tris-Puffer, pH = 8,4	Eigene Herstellung, Theresa Zipplies
Trizma-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trizma-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

#### 4.1.2.1 Poly(glycidole)

Bei den für die Herstellung der NP verwendeten Präpolymeren handelt es sich um thiol-funktionalisierte Polyglycidole (PG-SH) mit unterschiedlichen Eigenschaften und Molekulargewichten, welche von Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin nach einer Anleitung von Prof. Dr. Jürgen Groll und Kollegen synthetisiert und anschließend mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) und Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance = NMR) charakterisiert worden sind. [3] In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Präpolymere zum Einsatz, zum einen ein esterhaltiges PG-SH (PG<sub>EH</sub>-SH) [3], welches aus insgesamt 60 Einheiten, von denen wiederum 6 thiol-funktionalisiert sind, besteht, und zum anderen ein esterfreies PG-SH (PG<sub>EF</sub>-SH), welches sich aus 67 Glycidol- sowie 11 SH-Einheiten zusammensetzt.



**Abbildung 7:** Strukturformeln von esterhaltigem (1) und esterfreiem (2) PG-SH

In Abbildung 7 sind die Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Präpolymere dargestellt. Diese veranschaulichen, dass beim esterhaltigen PG-SH (PG<sub>EH</sub>-SH) die Thiol-Funktion über einen Ester an das Rückgrat des Polymers gebunden ist, wohingegen beim esterfreien PG-SH (PG<sub>EF</sub>-SH) keine solche Esterbindung vorkommt. Aufgrund dieser Tatsache weist PG<sub>EF</sub>-SH eine höhere Stabilität gegenüber Hydrolyse auf.

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Vertrieb</b>
BD Microlance 3 (Einweg-Kanülen)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Einweg-Spritzen (2 mL, 5 mL, 10 mL)	B. Braun AG, Melsungen
Eppendorf Safe-Lock Gefäße; 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf GmbH, Hamburg
epT.I.P.S. Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg
Falcon-Tubes (15 mL und 50 mL)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Glasröhrchen für Küvetten-Adapter, Borosilicate Glass Disposable culture tubes 6 x 50 mm	Kimble Chase Gerresheimer, Vineland, USA
Nylon-Filter (Porengröße: 1,2 µm)	GE Infrastructure, Water and Process Technologies, Freiburg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Spectra/Por Dialysis Membrane (MWCO 1000, 3000, 12000-14000)	Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA
Supra-Einmalkanülen mit Lanzettenschliff	Ehrhardt, Geislingen
UV-Einmal-Küvetten, halbmikro	Brand GmbH, Wertheim

### 4.1.4 HeLa-Zelllinie

HeLa-Zellen zählen zu den bekanntesten und in der Forschung am häufigsten verwendeten permanenten, humanen Zelllinien. <sup>[72]</sup> Es handelt sich um Epithel-Zellen, die einem Zervixkarzinom entstammen. Kultiviert wurden die HeLa-Zellen von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik am Biozentrum der Universität Würzburg.



## 4.2 Übersicht der synthetisierten Proben

**Tabelle 5:** Übersicht der mit einem Fluorophor markierten Thiomere

<b>Fluoreszenzmarkiertes Polymer</b>				
<b>Probe</b>	<b>Bezeichnung in vorliegender Arbeit</b>	<b>Art des Polymers</b>	<b>Menge des eingesetzten Polymers [mg]</b>	<b>Fluorophor [mg]</b>
1	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	54 Glycidol-Einheiten, 6 SH-Einheiten	200	1
2	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	54 Glycidol-Einheiten, 6 SH-Einheiten	200	1
3	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-1	67 Glycidol-Einheiten, 11 SH-Einheiten	200	5
4	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	67 Glycidol-Einheiten, 11 SH-Einheiten	200	10
5	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	67 Glycidol-Einheiten, 11 SH-Einheiten	200	5,57

**Tabelle 6:** Übersicht über die synthetisierten Nanogelee

Nanogelee						
Probe	Bezeichnung in vorliegender Arbeit	Art der Anbindung	Art des Polymers	Anteil des gelabelten Polymers an Gesamtmenge [%]	Tat [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Reaktionszeit [min]
6	NG_1	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH	-	-	20
7	NG_2	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH	-	-	20
8	NG_3	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH	-	-	20
9	NG_4	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH	-	-	20
10	NG_TAT_1	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH	-	50	20
11	NG_TAT_2	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH	-	50	20
12	NG680_1	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	20	-	20
13	NG680_2	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	5	-	20
14	NG680_3	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	5	-	20
15	NG680_4	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	100	-	20
16	NGCy7_1	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	100	-	20
17	NGCy5_1	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	100	-	20
18	NG680_TAT_1	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	40,4	50	20
19	NG680_TAT_2	redox-sensitiv	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	100	50	20
20	NGCy5_TAT_1	redox-sensitiv	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	100	50	20
21	NG_MA_1	Michael-Addition	PG <sub>EF</sub> -SH	-	-	20
22	NG_MA_2	Michael-Addition	PG <sub>EF</sub> -SH	-	-	40
23	NG680_MA_1	Michael-Addition	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	5	-	20
24	NGCy7_MA_1	Michael-Addition	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	100	-	20
25	NG_Click_1	Click-Chemie	PG <sub>EF</sub> -SH, PG- <i>stat</i> -AGE	-	-	120
26	NG_Click_2	Click-Chemie	PG <sub>EF</sub> -SH, PG- <i>stat</i> -AGE	-	-	120

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Funktionalisierung von Polymeren

#### 4.3.1.1 *Thiomer-Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680-Maleimid*

Mit Fluorophor funktionalisiertes  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  wurde mit Hilfe einer Michael-Addition, bei der die Maleimid-Gruppe des Farbstoffs Alexa Fluor mit den Thiol-Gruppen des  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  reagiert, hergestellt.

Hierfür wurden zunächst 200 mg (36,3  $\mu\text{mol}$ )  **$\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$**  je Ansatz ( $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  und  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$ ) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (pH = 7,4; Sigma-Aldrich), in den zuvor Argon eingeleitet wurde, gelöst. Das Volumen, das zum Lösen des Polymers eingesetzt wurde, entstammt Literaturangaben <sup>[16]</sup> und richtet sich nach dem Volumen, welches sich bereits bei der NP-Synthese bewährt hat. <sup>[3]</sup> Anschließend wurde 1 mg (0,87  $\mu\text{mol}$ ) **Alexa Fluor 680-Maleimid** ebenfalls in 500  $\mu\text{l}$  des mit Argon begasten PBS-Puffers (pH = 7,4) gelöst und die so entstandene Farbstofflösung zur  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$ -Lösung hinzu pipettiert. Die Reaktionslösung wurde gut durchmischt und durch das Zuführen von Argon eine Schutzatmosphäre aufgebaut. Daraufhin wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Parafilm luftdicht verschlossen, mit handelsüblicher Alufolie lichtgeschützt verpackt und die Reaktion bei 5°C über Nacht durchgeführt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung durch Dialyse (Ansatz 1: MWCO 3000; Ansatz 2: MWCO 1000) gegen Reinstwasser aufgereinigt (Anzahl der Wasserwechsel: 4, Gesamtdauer der Dialyse: 71,5 h). Das gelabelte Polymer wurde nach abschließender Gefriertrocknung (-5,2 °C, 160 mbar) erhalten. <sup>[73]</sup>

#### 4.3.1.2 Thiomer-Funktionalisierung mit Cy7-Maleimid

Analog der unter Punkt 4.3.1.1 beschriebenen Funktionalisierung erfolgte auch die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Cy7 an das Thiomer über eine Michael-Addition der Maleimidgruppe des Cy7-Fluorophors. Der Cy-Farbstoff unterscheidet sich gegenüber dem Alexa Fluor-Farbstoff durch seine geringe Wasserlöslichkeit, aufgrund derer die Fluorophor-Stammlösung in dem organischen Lösungsmittel DMSO hergestellt wurde.

In einem ersten Ansatz (PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1) wurden 200 mg (30,02 µmol) **PG<sub>EF</sub>-SH** in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und in 500 µl DMSO, welches zuvor mit Argon begast worden ist, gelöst. Es folgte die Herstellung einer Cy7-Maleimid-Stammlösung. Dafür wurden 5 mg (7,07 µmol) **Cy7-Maleimid** in 1 ml mit Argon begastem DMSO gelöst. Die Farbstofflösung wurde zu der PG<sub>EF</sub>-SH-Lösung hinzugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch das Zuführen von Argon eine Schutzatmosphäre aufgebaut, das Reaktionsgefäß luftdicht verschlossen und mit Alufolie vor Licht geschützt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 6 Stunden gerührt. Die Aufbereitung erfolgte durch Ausfällung mit Dichlormethan und abschließende Gefriertrocknung (-5,2 °C, 160 mbar).

In einem zweiten Ansatz (PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2) wurden 200 mg (30,02 µmol) **PG<sub>EF</sub>-SH** mit 10 mg (14,1 µmol) **Cy7-Maleimid** zur Reaktion gebracht. Die Herstellung der Polymer- und der Farbstoff-Lösungen sowie die Reaktionsbedingungen gleichen dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Prozess. Die Aufbereitung erfolgte jedoch durch Dialyse (MWCO 1000) gegen Reinstwasser (Anzahl der Wasserwechsel: 4, Gesamtdauer der Dialyse: 114,5 h) und abschließende Gefriertrocknung (-5,2 °C, 160 mbar).

#### 4.3.1.3 Thiomer-Funktionalisierung mit Cy5-Alkin

Das Konzept der Click-Chemie bietet eine weitere Möglichkeit mit Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiertes PG-SH herzustellen. Dabei reagiert das Alkin des Fluorophors Cy5-Alkin mit einer SH-Gruppe des PG-SH über eine UV-Click-Reaktion. Auch hier muss die Cy5-Stammlösung aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Cy5 in dem organischen Lösungsmittel DMSO hergestellt werden.

Für die Markierung von  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$  mit einem Cy5-Alkin (Ansatz:  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy5-1}}$ ) wurden 200 mg (30,02  $\mu\text{mol}$ )  **$\text{PG}_{\text{EF-SH}}$**  in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen. Anschließend wurde das Polymer in nur 400  $\mu\text{l}$  mit Argon begastem DMSO gelöst. Für die Herstellung der Fluorophor-Stammlösung wurden 5,57 mg (100,2  $\mu\text{mol}$ ) **Cy5-Alkin** eingewogen und in 100  $\mu\text{l}$  mit Argon begastem DMSO gelöst. Im nächsten Schritt wurden 70 mg (0,273 mmol) des Fotoinitiators **2-2-Dimethoxy-2Phenyl-acetophenon** (DMPA) zur  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$ -Lösung zugegeben. Nach sorgfältigem Lösen des Fotoinitiators wurde die Cy5-Stammlösung zur Polymer-DMPA-Lösung hinzu pipettiert und die so entstandene Reaktionslösung gründlich durchmischt. Das Reaktionsgefäß wurde auf einer Rührplatte in einem Abstand von 5 cm zur Lichtquelle im Strahlenfeld eines UV-Licht-Würfels (Wellenlänge des Lichts  $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) befestigt und die Konstruktion mit einem Karton als Sichtschutz abgedeckt. Nach 2-minütiger Bestrahlungszeit wurde das Licht ausgeschaltet und die Reaktion dadurch abgebrochen. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss an die Bestrahlung noch weitere 2 Minuten gerührt.

Die Aufreinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse (MWCO 1000) gegen Reinstwasser (Anzahl der Wasserwechsel: 6, Gesamtdauer der Dialyse: 50,5 h). Zur vollständigen Abtrennung des bei der Dialyse ausgefallenen wasserunlöslichen Fotoinitiators wurde die dialysierte Lösung zentrifugiert (Rotor 11180, 4500 U/min, 3893 x g) und der Überstand gefriergetrocknet (-5,2 °C, 160 mbar).

#### 4.3.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung des Fluorophors

Der Derivatisierungsgrad von  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-1}}$ ,  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-2}}$  und  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy5-1}}$  wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Da die Thiomer-Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680 aufgrund der geringen Verfügbarkeit im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden sollte, wurde der Derivatisierungsgrad von  $\text{PG}_{\text{EH-SH-AF680-1}}$  und  $\text{PG}_{\text{EH-SH-AF680-2}}$  nicht bestimmt.

Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine Methode, welche elektromagnetische Wellen des ultravioletten und des sichtbaren (engl. visible) Lichts, sowie des nahen Infrarotbereiches (Wellenlängenbereich insgesamt: 200 nm – 1100 nm) nutzt.

Um die Konzentration des Polymer-gebundenen Fluorophors bestimmen zu können, wurden zunächst Kalibriergeraden für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff erstellt. Dafür wurde 1 mg Cy5-Alkin bzw. 1 mg Cy7-Maleimid in jeweils 1 ml DMSO gelöst. Mit Hilfe der Farbstoff-Stammlösungen wurden Verdünnungen bekannter Konzentrationen in Wasser angefertigt. Die Konzentrationen der in Tabelle 7 aufgeführten Verdünnungsreihen wurden so gewählt, dass die photometrisch bestimmte Extinktion bei allen Proben unter einem Wert von 1 liegt.

**Tabelle 7:** Verdünnungsreihen der Fluorophor-Stammlösungen in Wasser

	Fluorophor-Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Wasser [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<b>Cy7</b>	4,12	995,88	4,10
	3,09	996,91	3,10
	2,06	997,94	2,10
	1,03	998,97	1,00
	0,50	999,50	0,50
<b>Cy5</b>	5,00	1995,00	2,50
	4,00	1996,00	2,00
	3,00	1997,00	1,50
	2,00	1998,00	1,00
	1,00	1999,00	0,50
	0,50	1999,50	0,25

Die Extinktionsspektren wurden mit Hilfe des UV/Vis-Spektrometers in 1 nm-Schritten im Bereich zwischen 400 nm und 900 nm aufgenommen. Die Messungen wurden im Fall von Cy7 viermal, im Fall von Cy5 dreimal durchgeführt. Die bekannte Konzentration wurde gegen den Mittelwert der Extinktion am Anregungsmaximum - gemittelt aus allen 4 (Cy7), bzw. 3 Messungen (Cy5) – aufgetragen und eine lineare Fitfunktion an die Daten angepasst, um eine Kalibriergerade zu erhalten. Das Excitationsmaximum für Cy7-Maleimid liegt bei 750 nm <sup>[74]</sup>, das für Cy5-Alkin bei 646 nm. <sup>[75]</sup>

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das mit Farbstoff funktionalisierte PG<sub>EF</sub>-SH in Wasser gelöst (siehe Tabelle 8) und ein Extinktionsspektrum aufgenommen. Anschließend wurde der Wert für die Extinktion am Anregungsmaximum abgelesen, in die Geradengleichung eingesetzt und so die Konzentration des an PG<sub>EF</sub>-SH gebundenen Cy7-Maleimids bzw. Cy5-Alkins berechnet.

**Tabelle 8:** Übersicht der Fluorophor-gelabelten Thiomer-Konzentrationen

Ansatz	PG <sub>EF</sub> -SH-Konzentration [mg/ml]
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-1	0,6
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	0,7
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	0,25

### 4.3.2 Nanopartikel-Herstellung in inverser Miniemulsion

Wie bereits unter Punkt 3.2.2 erläutert, existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren und Möglichkeiten, die eine NP-Synthese ermöglichen. In dieser Arbeit wurde die Herstellung von NP in inverser Miniemulsion gewählt. Die Herstellung der NG erfolgte in Anlehnung an zwei Veröffentlichungen von Professor J. Groll, S. Singh und Kollegen. <sup>[3] [16]</sup>

Die Darstellung der inversen Miniemulsion erfolgte in allen Fällen durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Horn für 60 s. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Beschallung: 0,4 s; Pause: 0,6 s; Intensität: 10 %.

#### 4.3.2.1 Redox-sensitive Nanopartikel

Für die Darstellung der inversen Miniemulsion wurden 14,06 mg des oberflächenaktiven Tensids Span 80 und 4,68 mg des Tensids Tween 80 (Verhältnis 3:1) in 625  $\mu$ l n-Hexan gelöst. Weiterhin wurde eine Lösung von 25 mg) **PG<sub>(EH/EF)</sub>-SH**, je nach Charge mit Fluorophor funktionalisiert, in 62,5  $\mu$ l PBS-Puffer (0,04 M; pH = 7,4) hergestellt. Die beiden Lösungen wurden in einem 15 ml-Falcon-Tube vereint und durch Schütteln gemischt. Die Herstellung der inversen Miniemulsion erfolgte durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Horn für 60 s. Um eine Überhitzung zu verhindern wurde die Probe während der Beschallung mit Hilfe eines Eisbads gekühlt. Anschließend wurden 30  $\mu$ l einer 0,1 molaren **Alloxan**-Lösung (hergestellt mit 0,04 molarem PBS-Puffer, pH = 7,4) zu der Miniemulsion gegeben, um die Quervernetzung der PG<sub>(EH/EF)</sub>-SH-Polymerketten über Disulfidbrücken zu initiieren. Direkt nach der Zugabe des Katalysators wurde die Reaktionslösung noch einmal für 60 s mit Ultraschall behandelt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin für 20 Minuten unter Eiskühlung kontinuierlich gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer **2-Hydroxyethylacrylat**-Lösung (HEA-Lösung) (30  $\mu$ l HEA in 1 ml 0,04 molarem PBS; pH = 7,4), die der Absättigung freier Thiol-Gruppen dient, gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 20 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Im



Anschluss wurde das Reaktionsgemisch in 2 kleinere Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße überführt und der Falcon-Tube mit 1 ml PBS-Puffer (0,04 M; pH = 7,4) gewaschen. Die Trennung der wässrigen Phase von der organischen Hexan-Phase erfolgte durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (Rotor 12 154-H, 3167 × g) und anschließendem Abnehmen des organischen Überstandes. Um die in der wässrigen Phase vorliegenden NP vollständig von Tensid-Resten und nicht abreagiertem Rest-Polymer zu befreien, wurden sie jeweils 3-mal mit 0,25 ml Hexan sowie 2-mal mit 0,5 ml THF gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Probe zentrifugiert (Rotor 12 154-H, 3167 × g, 20 min, 10 000 U/min), der Überstand entfernt und die zum Teil aggregierten NP wieder redispergiert. Die abschließende Aufreinigung und Entfernung der verbliebenen organischen Lösungsmittel erfolgte durch Dialyse (MWCO: 12 000 – 14 000) gegen Reinstwasser, im letzten Durchgang gegen 0,01 molaren PBS-Puffer (pH = 7,4). Die gereinigten NG-Dispersionen wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### ***4.3.2.2 Redox-sensitive Nanopartikel mit Zellaufnahmeprotein Tat***

Die Herstellung der NP, welche mit dem Zellaufnahmeprotein Tat funktionalisiert sind, erfolgte analog zu der Synthese der „Standard“-NP (siehe Kapitel 4.3.2.1). Der einzige Unterschied besteht in der Zusammensetzung der wässrigen Phase: Das je nach Verwendungszweck der NG mit Fluorophor funktionalisierte oder nicht funktionalisierte **PG<sub>(EH/EF)</sub>-SH** (eingesetztes Polymer siehe Tabellen 9 und 10) wurde in nur 60 µl 0,04 M PBS-Puffer (pH = 7,4) gelöst, anschließend wurden 2,5 µl einer Tat-Protein-Lösung (c = 50 mg/ml in 0,04 M PBS-Puffer [pH = 7,4]) der wässrigen Phase beigefügt, so dass das Verhältnis der organischen zur wässrigen Phase im Vergleich zu den „Standard“-NP beibehalten wird.

**Tabelle 9:** Übersicht der „Standard“-NP und NP mit Zellaufnahme-Protein Tat, hergestellt aus esterhaltigem/esterfreiem PG-SH

Probe	Art des Polymers	Tat [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	THF-Wasch- Schritt
NG_1	PG <sub>EH</sub> -SH	-	nein
NG_2	PG <sub>EH</sub> -SH	-	ja
NG_3	PG <sub>EF</sub> -SH	-	ja
NG_4	PG <sub>EF</sub> -SH	-	ja
NG_TAT_1	PG <sub>EF</sub> -SH	50	ja
NG_TAT_2	PG <sub>EF</sub> -SH	50	ja

**Tabelle 10:** „Standard“-NP und NP mit Zellaufnahme-Protein Tat, hergestellt aus Fluorophor funktionalisiertem esterhaltigem/esterfreiem PG-SH

Probe	Anteil des gelabelten Polymers an Gesamtmenge [%]	Art des Polymers	Tat [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	THF- Wasch- Schritt
NG680_1	20	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	-	nein
NG680_2	5	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	-	nein
NG680_3	5	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	-	nein
NG680_4	100	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	-	ja
NGCy7_1	100	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	-	ja
NGCy5_1	100	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	-	ja
NG680_TAT_1	40,4	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	50	nein
NG680_TAT_2	100	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	50	ja
NGCy5_TAT_1	100	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	50	ja

#### **4.3.2.3 Nicht redox-sensitive Nanopartikel via Michael-Addition**

Analog zur Herstellung der redox-sensitiven NP wurden für die Herstellung der inversen Miniemulsion 14,06 mg Span 80 und 4,68 mg Tween 80 (Tenside im Verhältnis 3:1) in 625  $\mu$ l n-Hexan gelöst. Für die Darstellung der wässrigen Phase wurden 25 mg **PG<sub>EF</sub>-SH**, je nach Verwendungszweck mit Fluorophor funktionalisiert, in 62,5  $\mu$ l 0,04 M Phosphat-Puffer (pH = 8) gelöst. Die beiden Phasen wurden zusammen in einen 15 ml-Falcon-Tube gegeben und durch Schütteln gemischt. Es folgte die Darstellung der inversen Miniemulsion durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Horn für 60 s analog zu der Synthese der redox-sensitiven NP unter Eiskühlung (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Direkt im Anschluss an die Beschallung wurden 7  $\mu$ l (7,82 mg; 13,6  $\mu$ mol) **Polyethylenglycol-Diacrylat** (PEGDA), bzw. 14  $\mu$ l (15,64 mg; 27,2  $\mu$ mol) zu der Miniemulsion hinzu pipettiert. Nach der Zugabe von PEGDA, das als Quervernetzer zwischen den Thiol-Gruppen der Polymere fungiert, wurde die Reaktionslösung noch einmal für 60 s mit Ultraschall behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 20 bzw. 40 Minuten unter Eiskühlung kontinuierlich gerührt. Nach Ablauf der 20 bzw. 40 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe einer **HEA**-Lösung (30  $\mu$ l HEA in 1 ml 0,04 M Phosphat-Puffer; pH = 8) gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 20 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung in 2 kleinere Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße überführt und der Falcon-Tube mit 1 ml 0,04 M Phosphat-Puffer (pH = 8) gewaschen. Die Trennung der wässrigen Phase von der organischen Hexan-Phase erfolgte durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (Rotor 12 154-H, 3167 x g) und anschließendem Abnehmen des organischen Überstandes. Die weitere Aufbereitung, Aufreinigung und Lagerung der in der wässrigen Phase vorliegenden NP erfolgte analog dem unter Punkt 4.3.2.1 beschriebenen Procedere.

**Tabelle 11:** Nicht redox-sensitive NP, hergestellt via Michael-Addition

Probe	Anteil des gelabelten Polymers an Gesamtmenge [%]	Art des Polymers	PEGDA [ $\mu$ l]	Reaktionszeit [min]	THF-Wasch-Schritt
NG_MA_1	-	PG <sub>EF</sub> -SH	7	20	ja
NG_MA_2	-	PG <sub>EF</sub> -SH	14	40	ja
NG680_MA_1	5	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-1	7	20	nein
NGCy7_MA_1	100	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	7	20	ja

#### 4.3.2.4 Nicht redox-sensitive Nanopartikel via UV-Click-Reaktion

Eine weitere Methode nicht reduktiv degradierbare NG zu synthetisieren ist die Herstellung über UV-induzierte Click-Chemie.

Auch in diesem Fall wurden entsprechend der bereits beschriebenen Partikel-Synthesen 14,06 mg Span 80 und 4,68 mg Tween 80 (Verhältnis 3:1) in 625  $\mu$ l n-Hexan gelöst, während 12,5 mg **PG<sub>EF</sub>-SH** und 12,5 mg **PG-stat-AGE** in 62,5  $\mu$ l 0,04 M PBS-Puffer (pH = 7,4) gelöst wurden. Die beiden Lösungen wurden zusammen in einen 15 ml-Falcon-Tube gegeben und durch Schütteln gemischt. Es folgte die Herstellung der inversen Miniemulsion durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Horn für 60 s unter Kühlung mit Hilfe eines Eisbads. Unmittelbar nach der Ultraschallanwendung wurden 4,5 mg (17,6  $\mu$ mol) des Fotoinitiators **2-2-Dimethoxy-2Phenyl-acetophenon** (DMPA) zu der Miniemulsion hinzugegeben und diese anschließend noch einmal 60 s mit Hilfe des Ultraschall-Horns unter Eiskühlung beschallt. Es folgte die UV-induzierte Quervernetzung der Polymere. Dazu wurde das Reaktionsgefäß mit der darin enthaltenen Miniemulsion bei Raumtemperatur auf einer Rührplatte im Strahlenfeld von 4 UV-Licht-Würfeln (Wellenlänge des Lichts  $\lambda$ : 360 nm)

befestigt, die Konstruktion mit einem Karton als Sichtschutz abgedeckt, der Laser eingeschaltet und die Reaktion so gestartet. Nach 120 Minuten wurde der Licht abgeschaltet und die Reaktion abgebrochen. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch in 2 kleinere Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße überführt und der Falcon-Tube mit 1 ml 0,04 M PBS-Puffer (pH = 7,4) gewaschen. Die Trennung der wässrigen Phase von der organischen Hexan-Phase erfolgte durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (Rotor 12 154-H, 3167 × g) und anschließendem Abnehmen des organischen Überstandes. Im Fall des ersten auf diese Weise hergestellten NG NG\_Click\_1 war die Aufbereitung und Aufreinigung der NP im Weiteren identisch der Vorgehensweise bei den redox-sensitiven NP (3-maliges Waschen mit 0,25 ml Hexan, 2-maliges Waschen mit 0,5 ml THF). Bei der Aufbereitung von NG\_Click\_2 entfielen die Waschschrte mit organischen Lösungsmitteln. Stattdessen wurden die Partikel 2-mal mit 0,5 ml eines 0,04 M PBS-Puffers gewaschen. Auch hier wurde der Überstand, sofern sich dieser beim Zentrifugieren gebildet hatte, abgenommen und die aggregierten NP wurden wieder gelöst. Die abschließende Aufreinigung und Entfernung der verbliebenen organischen Lösungsmittel erfolgte in beiden Fällen durch Dialyse (MWCO: 12 000 – 14 000) gegen Reinstwasser, im letzten Durchgang gegen 0,01 M PBS-Puffer (pH = 7,4). Die gereinigten NG-Dispersionen wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

**Tabelle 12:** Nicht redox-sensitive NP, hergestellt via UV-Click-Reaktion

Probe	Art des Polymers	Wasch-Schritt mit org. Lösungsmitteln
NG_Click_1	PG <sub>EF</sub> -SH, PG- <i>stat</i> -AGE	ja
NG_Click_2	PG <sub>EF</sub> -SH, PG- <i>stat</i> -AGE	nein

### **4.3.3 Charakterisierung der Nanopartikel**

Bei der Partikelcharakterisierung kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung: Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) und Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Das jeweilige Funktionsprinzip wurde bereits im Kapitel 3.3 „Charakterisierung von kolloidalen Systemen“ erläutert.

#### ***4.3.3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)***

Bei der Charakterisierung mittels DLS wurden die reinen NP-Lösungen verwendet. 300 µl der NG-Proben wurden unverdünnt und ungefiltert bei Raumtemperatur gemessen. Die Messung erfolgte in 3 Zyklen mit einer jeweiligen Dauer von 5 Minuten. Für die Viskosität der wässrigen Lösungen wurde ein Wert von 0,933 cPs und für den Brechungsindex ein Wert von 1,333 angenommen. Diese Werte entsprechen den für Wasser bekannten Daten bei Raumtemperatur. Die Wellenlänge  $\lambda$  des verwendeten Lasers betrug 635 nm bei einem Winkel von 90 Grad zwischen Lichtquelle und Detektor.

#### ***4.3.3.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)***

Die Vorbereitung der Proben für die Partikelcharakterisierung mittels NTA beinhaltete eine Verdünnung der NP-Lösung und anschließendes Filtern. Die ursprünglichen NG wurden je nach Opazität bzw. Farbintensität bei den Fluorophor enthaltenden Lösungen um einen Faktor von 10 bis 780 verdünnt (vgl. Tabelle 13). Das Volumen der verdünnten NP-Lösungen betrug stets 2 ml, da der Verlust durch das Filtern erfahrungsgemäß mindestens 0,5 ml Lösung beträgt. Als Filtermaterial wurde Nylon mit einer Porengröße von 1,2 µm gewählt.

Die für die Aufnahme und die Analyse des Videos verwendeten Einstellungen wie Camera Level und Detection Threshold (Erfassungsschwelle) variierten von Messung zu Messung. Die Dauer der Videoaufnahme betrug immer 60 s. Bei der Wahl des Camera Levels war darauf zu achten, ein Level einzustellen, welches die Partikel zwar erkennen, sie aber nicht von Anfang an zu intensiv erscheinen

lässt, um eine Störung der Partikeldetektion durch Überstrahlung zu vermeiden. Der Detection Threshold war so zu bestimmen, dass die Software der NTA auch kleine Partikel noch mit in die Analyse einbezogen, „zu kleine“ Partikel, Unreinheiten und überstrahlte Bereiche im Hof größerer Partikel aber nicht mitberücksichtigt wurden.

**Tabelle 13:** Verdünnungen der Proben für die Partikelcharakterisierung mittels NTA

<b>Probe</b>	<b>Verdünnungsfaktor</b>
NG_1	10
NG_2	10 und 15
NG_3	780
NG_4	39
NG_TAT_1	780
NG_TAT_2	39
NG_MA_1	39
NG_MA_2	40
NG_Click_1	39
NG_Click_2	30
NG680_1	15
NG680_2	15 und 30
NG680_3	30
NG680_4	15 und 30
NG680_TAT_1	30
NG680_TAT_2	30 und 39
NGCy7_1	80
NGCy5_1	15
NGCy5_TAT_1	15
NG680_MA_1	30
NGCy7_MA_1	80

#### **4.3.4 Bestimmung der Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen**

##### ***4.3.4.1 Vorbereitung der Proben***

Getestet wurde die Stabilität eines redox-sensitiven und eines nicht redox-sensitiven via Michael-Addition hergestellten NG. Verwendet wurde nur die stabile, klare NG-Phase, die keinerlei Aggregate enthält. Dafür wurden pro NG jeweils 6 Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße unter sterilen Bedingungen mit 2000 µl DMEM (Medium) befüllt. Zu dem Medium wurden anschließend 50 µl der redox-sensitiven NP-Lösung (NG\_3), bzw. 50 µl der via Michael-Addition hergestellten NP-Lösung (NG\_MA\_1) unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert.

##### ***4.3.4.2 Versuchsaufbau***

Die insgesamt 12 Proben wurden bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 7 d und 14 d erfolgte die Entnahme einer Probe pro NG aus dem Wärmeschrank zur Bestimmung der Partikelgröße und der Partikelkonzentration mit Hilfe einer NTA-Messung. Die Proben wurden ohne weitere Verdünnung oder Filterung gemessen, um Verunreinigungen, Aggregatbildung oder einen Verlust an Partikeln zu vermeiden. Die Messungen wurden 4- bis 5-mal wiederholt. Zusätzlich wurde zum Zeitpunkt 0 eine Charakterisierung der NP in DMEM durchgeführt, um einen Ausgangswert für Größe und Konzentration zu erhalten.



### 4.3.5 Wechselwirkung von redox-sensitiven Nanopartikeln mit Bovinem Serumalbumin

#### 4.3.5.1 Labeling von Bovinem Serumalbumin mit Cy5-NHS-Ester

Zur Markierung von Proteinen mit einem Fluoreszenzfarbstoff wird in der Regel ein Fluorophor, das eine NHS-Ester-Funktionalität besitzt, verwendet. Grund dafür ist die Fähigkeit des NHS-Esters mit Aminofunktionen, wie sie in Proteinen und Peptiden vorkommen, kovalente Bindungen einzugehen.

Die Vorgehensweise bei der Funktionalisierung von BSA mit Cy5-NHS-Ester wurde einem Protokoll der Herstellerfirma des Fluorophors entnommen. <sup>[76]</sup>

Zunächst wurden 50 mg **BSA** abgewogen und die benötigte Farbstoffmenge mit Hilfe der auf dem Protokoll angegebenen Formel (3) berechnet.

$$NHS - Ester[mg] = \frac{8 \times \text{zu labelndes BSA [mg]} \times \text{Molgewicht NHS-Ester[Da]}}{\text{Molgewicht BSA[Da]}} \quad (3)$$

Das Gesamt-Volumen der Reaktionslösung, die im Idealfall eine Proteinkonzentration von 1-10 mg/ml aufweisen soll, betrug 5 ml. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Cy5-NHS-Esters wurde zur Herstellung der Farbstoff-Stammlösung DMSO verwendet. Dazu wurden 3,6 mg (5,84 µmol) **Cy5-NHS-Ester** in 500 µl DMSO gelöst. Das Protein (50 mg; 758 nmol) wurde hingegen in 4500 µl 0,1 M Tris-Puffer (pH = 8,4) gelöst. Nach erfolgter Auflösung des Proteins wurde die Cy5-Lösung zur BSA-Lösung gegeben und durchmischt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 4 h kontinuierlich gerührt und vor Licht geschützt. Die Abtrennung des nicht reagierten Rest-Farbstoffes und des organischen Lösungsmittels, sowie das Reinigen des Reaktionsproduktes erfolgten durch Ausfällung mit Ethanol. Nach Zugabe von Ethanol im Überschuss wurde die Reaktionslösung für 30 min bei 4500 Umdrehungen pro Minute (Rotor 11180, 3893 x g) zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen und das ausgefallene mit Cy5 funktionalisierte BSA nach der Gefriertrocknung (-5,2 °C; 160 mbar) erhalten.

#### **4.3.5.2 Charakterisierung der Nanopartikel-Serumalbumin-Wechselwirkungen mittels UV/Vis-Spektroskopie**

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie sollten Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von redox-sensitiven NP mit BSA durchgeführt und ein Nachweis für eine mögliche Proteinadsorption an die Partikel erbracht werden.

Es gilt: die Extinktion eines Stoffes am Excitationsmaximum ist proportional zur Konzentration dieses Stoffes. Um eine Konzentrationsbestimmung von mit Cy5 (Excitationsmaximum = 646 nm) markiertem BSA durchführen und somit auch die Proteinadsorption nachweisen zu können, wurde zunächst eine Kalibriergerade für mit Cy5-NHS-Ester funktionalisiertes BSA erstellt. Hierfür wurde 1 mg BSA-Cy5 in 10 ml 0,1 M PBS-Puffer (pH = 7,4) gelöst. Von dieser Stammlösung ( $c = 100 \mu\text{g/ml}$ ) ausgehend wurden anschließend mit 0,1 M PBS-Puffer Verdünnungen bekannter Konzentrationen angefertigt. Für jede Probe der Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe des UV/Vis-Spektrometers ein Extinktionsspektrum im Bereich zwischen 400 nm und 800 nm aufgenommen. Die Messung wurde im Triplikat durchgeführt. Für das Erstellen der Kalibriergeraden wurde die bekannte Konzentration gegen den Mittelwert der Extinktion am Anregungsmaximum - gemittelt aus allen 3 Messungen – aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die daraus erhaltene Geradengleichung wurde zur Berechnung der Farbstoffkonzentration herangezogen. Das Excitationsmaximum liegt bei 646 nm.

Nach Ermittlung der Geradengleichung wurden die zu messenden Proben zur Bestimmung der Proteinadsorption vorbereitet. Dafür wurden insgesamt 3 Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße zunächst mit jeweils 1 ml NP-Lösung (Probe 1: NG\_2; Probe 2: NG\_3; Probe 3: NG\_TAT\_1) befüllt und 0,2 ml einer mit Cy5-NHS-Ester funktionalisierten BSA-PBS-Lösung (pH = 7,4; BSA 50  $\mu\text{g/ml}$ )

hinzugefügt. Die BSA-Cy5-Konzentration der Proben betrug somit 8,3 µg/ml. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (Rotor 12154-H, 4434 × g) zentrifugiert. Es folgte die Messung der Extinktion des Überstandes mit dem UV/Vis-Spektrophotometer. Ein Extinktionsspektrum wurde für den Wellenlängenbereich von 400 nm bis 800 nm aufgenommen. Die BSA-Cy5-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe der zuvor bestimmten Geradengleichung durch Einsetzen des Extinktions-Wertes am Anregungsmaximum berechnet. Die Menge des an die NP absorbierten BSA wurde anhand der Proteinkonzentration im Überstand und der Menge des zu Beginn des Versuchs hinzugegebenen BSA ermittelt.

#### **4.3.6 Untersuchungen zur Zellaufnahme redox-sensitiver Nanopartikel**

##### **4.3.6.1 Zellkultur**

Alle Studien zur Zellaufnahme von redox-sensitiven NP wurden unter Verwendung von HeLa-Zellen durchgeführt. Die verwendeten HeLa-Zellen entstammen der laufenden Zellkultur des Biozentrums der Universität Würzburg. Die Kultivierung erfolgte vor Ort durch die technischen Angestellten.

##### *4.3.6.1.1 Kultivierung der HeLa-Zelllinie*

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in Standard-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%. Als Nährmedium kam RPMI-1640, welches bereits vom Hersteller aus Natriumbicarbonat und L-Glutamin enthält, zum Einsatz. Zusätzlich wurden 100 Einheiten Penicillin pro Milliliter, 100 Einheiten Streptomycin pro Milliliter, 10 % FCS (fetal calf serum), nicht essentielle Aminosäuren sowie Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt. Das Passagieren, das bedeutet die Verdünnung der Zelldichte und das Anlegen einer Subkultur, erfolgte bei Erreichen der 70%igen Konflueszenz (zu 2/3 geschlossene Monolayer-Decke), ca. dreimal pro Woche. Für die Durchführung der Zellpassage wurde das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit PBS

gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden durch 10-minütiges Einwirken einer Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) vom Flaschenboden abgelöst. Das proteolytisch aktive Verdauungsenzym Trypsin sorgt für die Ablösung der HeLa-Zellen von der Unterlage, während EDTA der Komplexbildung von Calcium- und Magnesium-Ionen dient.<sup>[77]</sup> Nach 10 Minuten wurde erneut das Medium RPMI-1640 hinzugegeben und die Zellsuspension daraufhin zentrifugiert. Es folgte das Abschütten des Überstandes, die Redispergierung des Zell-Pellets in RPMI-1640 und die Überführung in ein neues Kultivierungsgefäß.

Für die Mikroskopie-Messungen mussten die HeLa-Zellen in Mikroskopie-Kammern überführt und kultiviert werden. Die Kultivierung in Sarstedt-Kammern (8-well) mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well erfolgte im Brutschrank, beginnend 24 h vor einer Messung. Wie bei der laufenden Zellkultur beschrieben wurde RPMI-1640 mit den oben genannten Zusätzen als Nährmedium verwendet, jedoch ohne Zusatz von Phenolrot.

#### ***4.3.6.2 Fluoreszenz Mikroskopie – in vitro live imaging***

Die Untersuchungen zur Aufnahme von redox-sensitiven NP in die Zelle wurden von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik am Biozentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Für die Messungen kam ein Weitfeld-Mikroskop (Olympus IX71 für Fluoreszenz-Mikroskopie, Fa. Olympus America Inc. USA) zur Anwendung.

Das Weitfeld-Mikroskop setzte sich aus einem Anregungsarm, einem Mikroskop und einem Detektionsarm zusammen. Jede dieser drei genannten Einheiten war fest auf einem schwingungsgedämpften Optiktisch verankert.

Für die Messungen wurde die HeLa-Zellen enthaltende Messkammer über dem Ölimmersionsobjektiv mit 60facher Vergrößerung (NA = 1,35, UPlanSApo 60XO, Olympus) des inversen Mikroskops (Olympus IX71) positioniert. Der vom Anregungsarm ausgehende Laserstrahl wurde auf die hintere Fokalebene des

Objektivs fokussiert. Dadurch wurde das anregende Licht ausgeweitet, was dazu führte, dass es parallel auf die Probe treffen konnte. Um die mit AlexaFluor 680 (Anregungsmaximum: 680 nm) oder Cy5 (Anregungsmaximum: 647 nm) markierten NG-Partikel identifizieren zu können, wurden ein 640 nm-Diodenlaser (OBIS 640 LX, Coherent, max. 100 mW) und die dazu passenden Filter (Anregung: LD01-640/8, Semrock; Emission: ET700/75m Bandpass, Chroma Technology) eingesetzt. Das von den angeregten Partikeln emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch das Objektiv wieder aufgenommen. Die Trennung von den Anregungswellenlängen erfolgte mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels (Q6601p, Chroma Technology). Anschließend wurde die emittierte Strahlung an eine CCD-Kamera (pco.pixelfly usb, PCO) weitergeleitet. <sup>[78]</sup> <sup>[79]</sup> <sup>[80]</sup>

Die Inkubation der HeLa-Zellen mit NP in den Messkammern erfolgte mit 50  $\mu$ l NG-Stammlösung (Konzentrationen zwischen  $8 \times 10^{11}$  und  $1,8 \times 10^{10}$ ) auf 500  $\mu$ l Medium oder 500  $\mu$ l PBS pro Well. Während die Inkubationszeit variierte (1 h, 1,45 h, 2 h, 4 h, 8 h), betrug die Belichtungszeit stets 25 ms bei einer Laserintensität von 100 mW.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Funktionalisierung von Polyglycidol-Thiomerer

Die Funktionalisierung von Polymeren ist eine weit verbreitete Methode, welche es ermöglicht, reaktive Gruppen einzuführen und diese zum Beispiel für die Anbindung von Peptiden zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit wurde das  $\text{PG}_{(\text{EH}/\text{EF})}\text{-SH}$  mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen funktionalisiert, um die daraus hergestellten NP für die Methoden der Fluoreszenz-Mikroskopie und der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie sichtbar zu machen. Dabei sollte in erster Linie ein möglichst effizientes und reproduzierbares Verfahren zur Markierung von  $\text{PG}_{(\text{EH}/\text{EF})}\text{-SH}$  mit einem Fluorophor gefunden werden. Insbesondere war darauf zu achten, das  $\text{PG}_{(\text{EH}/\text{EF})}\text{-SH}$  ausreichend zu funktionalisieren ohne störende Quenching-Effekte, das bedeutet ein gegenseitiges Auslöschen der Farbstoffmoleküle, hervorzurufen.

#### 5.1.1 Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680-Maleimid

Für die beiden Ansätze  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  und  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$ , die sich weder in der Menge des eingesetzten Polymers noch in der Menge des für die Reaktion verwendeten Alexa Fluor-Maleimids unterscheiden, gilt, dass bei 100%igem Umsatz der Reaktion lediglich jede 41. Polymerkette mit einem Fluorophor-Molekül funktionalisiert wird. Da sich das Dialysewasser bei der Aufreinigung, die der Entfernung freien, nicht abreagierten Farbstoffs dient, auch nach dem ersten Dialysewasser-Wechsel in der Farbe des Farbstoffes noch leicht blau färbt, ist davon auszugehen, dass der Umsatz bezüglich des Farbstoffs Alexa Fluor-Maleimid unter 100% liegt. Weiterhin trat bei der Dialyse des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  (MWCO 3000) auch ein Verlust von 57% des zu Reaktionsbeginn eingesetzten Polymers auf. Es handelt sich hierbei wohl um niedermolekulare Bestandteile des Ausgangspolymers welche, wie man aus der Färbung des Dialysats schließen kann, teilweise auch markiert sind. Die Blaufärbung des Dialyse-Wassers kommt somit durch die Kombination von

freiem Alexa Fluor 680 und an  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$  gekoppeltes Alexa Fluor 680 zustande. Um den Polymerverlust zu verringern wurde bei der Aufarbeitung weiterer Ansätze ein Dialyseschlauch mit MWCO 1000 verwendet. Infolgedessen fällt der Verlust an Polymer bei dem Ansatz  $\text{PG}_{\text{EF-SH-AF680-2}}$  mit 21% deutlich geringer aus. Der tatsächliche Markierungsgrad der mit Alexa Fluor 680-Maleimid markierten Polymere wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen Verfügbarkeit des Fluoreszenzfarbstoffes nicht untersucht.

### 5.1.2 Funktionalisierung mit Cy7-Maleimid

Tabelle 14 fasst die Funktionalisierung von  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$  mit Cy7-Maleimid kurz zusammen.

**Tabelle 14:** Funktionalisierung von  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$  mit Cy7-Maleimid

Ansatz	$\text{PG}_{\text{EF-SH}}$ [mg]	Cy7- Maleimid [mg]	100%iger Umsatz theoretisch	Aufreinigungs- methoden	Ausbeute [%]
$\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-1}}$	200	5	Markierung jeder 4. Polymerkette	Ausfällen mit Dichlormethan	46
$\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-2}}$	200	10	Markierung jeder 2. Polymerkette	Dialyse, MWCO 1000	55

Die Ansätze  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-1}}$  und  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-2}}$  differieren gegenüber den Umsetzungen mit Alexa Fluor 680-Maleimid darin, dass esterfreies Polymer eingesetzt wurde, sowie in der Menge des für die jeweilige Reaktion eingesetzten Fluorophors und in der für die abschließende Aufreinigung verwendeten Methode. Im Fall von  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-1}}$  wurden 5 mg Cy7-Maleimid in die Reaktion eingebracht, was bei vollständigem Umsatz zu einer Funktionalisierung jeder 4.  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$ -Kette führt. Dahingegen wurde im Fall von  $\text{PG}_{\text{EF-SH-Cy7-2}}$  die doppelte Menge Cy7-Maleimid (10 mg) verwendet, was bei 100%igem Umsatz auch in der Funktionalisierung doppelt so vieler Polymerketten, genauer gesagt jeder 2.

Kette, resultiert. Die Aufbereitung des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy7-1}$  erfolgte durch Ausfällen mit Dichlormethan, wohingegen der Ansatz  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy7-2}$  gegen Reinstwasser dialysiert wurde. Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass bei beiden Aufbereitungsmethoden ein Verlust an Polymer zu verzeichnen ist, bei  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy7-1}$  sind es 54%, bei  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy7-2}$  sind es 45%.

Wie bereits bei der Dialyse der mit Alexa Fluor-Maleimid funktionalisierten Ansätze, zeigt sich auch bei der Dialyse von  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy7-2}$  eine Einfärbung des Dialysewassers, die aber deutlich intensiver ausfällt und auch beim 4. Dialysewasser-Wechsel noch mit bloßem Auge detektierbar ist. Diese starke Grünfärbung ist sicher auf die im Gegensatz zu  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  und -2 deutlich größere Menge eingesetzten Farbstoffes zurückzuführen und lässt auch hier darauf schließen, dass kein 100%iger Reaktionsumsatz stattgefunden hat, sondern freies Cy7-Maleimid zusammen mit an  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH}$  gebundenem Fluorophor bei der Dialyse verloren geht.

#### ***5.1.2.1 Bestimmung des Markierungsgrades durch UV/Vis-Spektroskopie***

Da insbesondere die Effizienz dieser Reaktion von Interesse ist, wird mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibriergeraden, die Cy7-Maleimid-Konzentration in den Produkten beider Ansätze ermittelt, um die Menge des an  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH}$  gebundenen Farbstoffs zu kalkulieren. Das Vorgehen bei der Konstruktion der Kalibriergeraden wurde in Kapitel 4.3.1.4 erläutert. In Abbildung 8 sind die mittels UV/Vis-Spektroskopie aufgezeichneten Extinktionsspektren (auch als dekadische Absorbanzspektren bezeichnet) von Cy7-Lösungen bekannter Konzentration, die im Zusammenhang mit der Erstellung der Kalibriergeraden aufgenommen worden sind, dargestellt. Bei den gezeigten Extinktionsspektren handelt es sich nicht um Messdaten einer einzigen Messung. Die aufgezeigten Extinktionsspektren wurden vielmehr über die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus allen gemessenen und zu einer Wellenlänge zugehörigen Extinktionswerten gezeichnet. Abbildung 9 zeigt die aus den 4 Messungen gemittelte Kalibriergerade. Die Beziehung zwischen der Extinktion und der Cy7-



Maleimid-Konzentration wird durch die Geradengleichung  $y = 0,16454 x$  beschrieben. Dabei gilt das Lambert-Beersche Gesetz (siehe Formel 4), welches besagt, dass die Lichtabsorption einer farbigen Lösung proportional zur Konzentration einer in einem farblosen Lösungsmittel gelösten Substanz und bei konstanter Konzentration der gelösten Substanz proportional zur Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe ist. Die Extinktion ist ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung und abhängig von deren Wellenlänge. Vernachlässigt man, wie in analytischen Anwendungen oft gebräuchlich, die an der Abschwächung der Strahlung beteiligten Prozesse Beugung und Streuung sowie Lumineszenz spricht man auch von dekadischer Absorbanz  $A_{10}$ . Das bedeutet: bei einer Konzentration von  $c = 0$  ist die dekadische Absorbanz  $A_{10} = 0$  (bzw. bei  $c = 0$  ist  $E = 0$ ).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

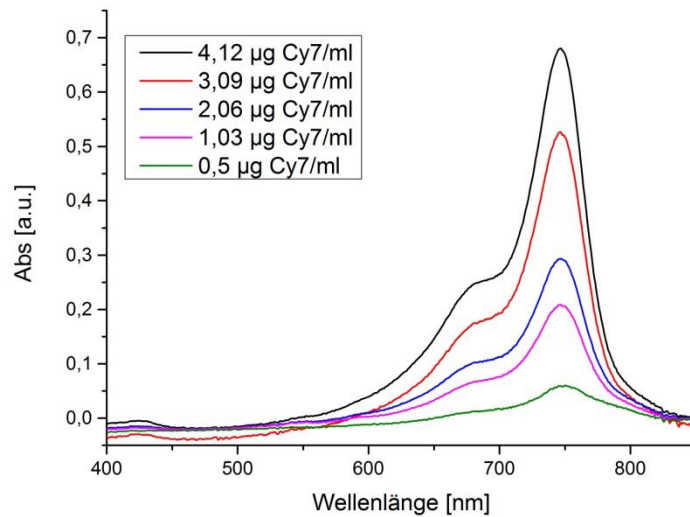
(4)

$A(\lambda)$  = (auch  $A_{10}$ ) dekadische Absorbanz für Licht der Wellenlänge  $\lambda$   
(früher  $E$  = Extinktion)

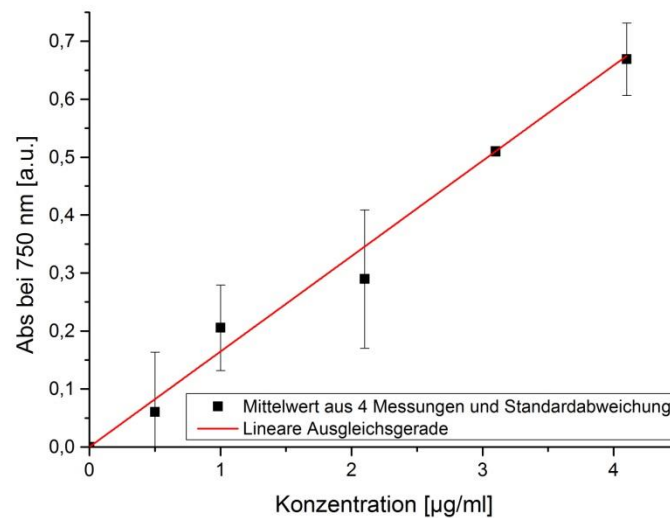
$\varepsilon(\lambda)$  = molarer (dekadischer) Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ )

$c$  = Konzentration der Lösung ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$d$  = Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe (m)

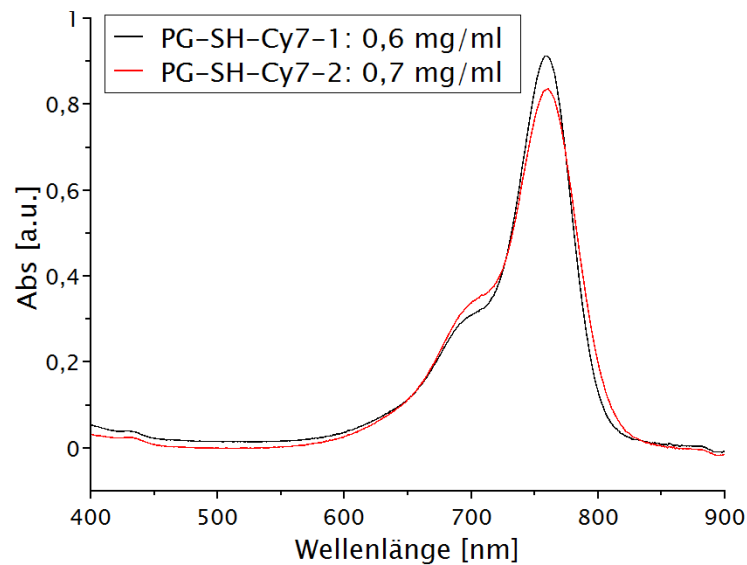


**Abbildung 8:** UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie einer Cy7-Maleimid-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen – mittleres Extinktionsspektrum bestimmt aus 4 Messungen



**Abbildung 9:** Kalibriergerade zur Bestimmung der in einer PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-Lösung befindlichen Cy7-Maleimid-Konzentration – basierend auf der Extinktion des Farbstoffs Cy7-Maleimid am Anregungsmaximum (Geradengleichung:  $y = 0,16454 x$ )

Für die Berechnung der in den Reaktionsprodukten der beiden Ansätze PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 und PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 vorhandenen Cy7-Maleimid-Konzentration (in µg/ml) wird der jeweilige Extinktionswert am Anregungsmaximum (750 nm) bestimmt und in die Geradengleichung  $y = 0,16454 x$  eingesetzt. Abbildung 10 zeigt die mittels UV/Vis-Spektroskopie aufgenommenen Extinktionsspektren der beiden mit Cy7-Maleimid funktionalisierten PG.



**Abbildung 10:** Extinktionsspektren der Reaktionsprodukte aus den 2 Ansätzen zur Funktionalisierung von PG<sub>EF</sub>-SH

Damit die Effektivität der beiden Reaktionen besser verglichen werden kann, erfolgt die Umrechnung in die Stoffmenge  $n$  (MW Cy7-Maleimid: 707,34 g/mol). In Tabelle 15 sind die Ergebnisse dieser Berechnungen aufgeführt.

**Tabelle 15:** Cy7-Maleimid-Konzentration und –Stoffmenge in mit Cy7 funktionalisiertem PG<sub>EF</sub>-SH

Ansatz	Konzentration der PG-SH-Cy7-Lösungen [mg/ml]	Stoffmenge n von PG-SH-Cy7 in den Lösungen [nmol]	Cy7-Maleimid-Konzentration [µg/ml]	Stoffmenge n von Cy7 [nmol]	Stoffmenge n von Cy7 in 25 mg PG-SH-Cy7 [nmol]
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-1	0,6	90,1	5,04	7,13	297,08
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	0,7	105,1	4,64	6,56	234,29

Der erwartete Markierungsgrad der PG<sub>EF</sub>-SH-Ketten wurde nicht erreicht: Anstatt dass jede 4. (25% Markierungsgrad) bzw. jede 2. (50% Markierungsgrad) PG-SH-Kette markiert wurde, wurde für beide Ansätze lediglich ein Markierungsgrad von ca. 6-8 % (d.h. ca. jede 13. -16. Kette) gefunden, wobei auch die Verdopplung der eingesetzten Cy7-Maleimid-Menge zu keiner Erhöhung des Markierungsgrades geführt hatte.

Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der Markierungsgrad des PG<sub>EF</sub>-SH jedoch als ausreichend beurteilt.

### 5.1.3 Funktionalisierung mit Cy5-Alkin

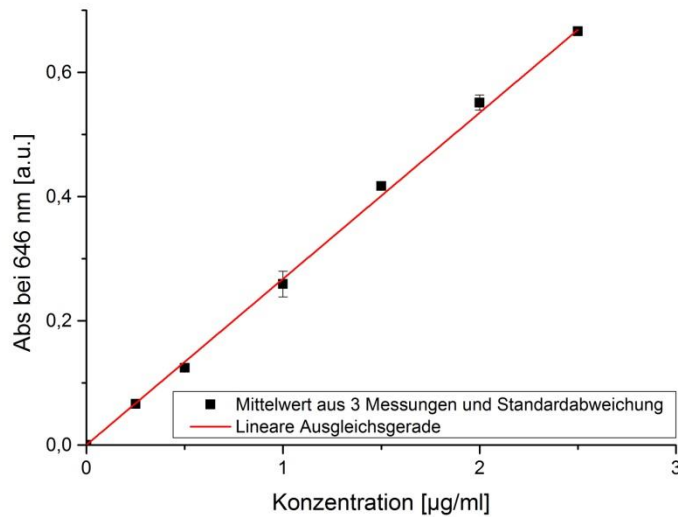
Für die Funktionalisierung von PG<sub>EF</sub>-SH mit Cy5-Alkin über eine UV-induzierte Click-Reaktion wurden 200 mg (30,02 µmol) Polymer und 5,57 mg (100,2 µmol) Cy5-Alkin eingesetzt. Bei 100%igem Umsatz sollte somit eine Thiol-Gruppe jeder 3. Polymerkette mit einem Fluorophor-Molekül reagieren. Bei der Aufreinigung des Reaktionsproduktes mittels Dialyse (MWCO 1000) ist auch hier eine sehr starke Blau-Färbung des Dialyse-Wassers zu erkennen, was für einen unvollständigen Umsatz der Reaktion und einen nicht unerheblichen Verlust an Farbstoff, sowohl in freier als auch in an PG<sub>EF</sub>-SH gebundener Form, spricht. Auffallend groß ist der Verlust an Polymer. Nach abgeschlossener Dialyse

(MWCO 1000) und Gefriertrocknung wurden 51 mg Produkt isoliert, entsprechend einer Ausbeute von 25 % bezogen auf das eingesetzte PG<sub>EF</sub>-SH.

Vergleicht man die Ausbeute an Produkt nach Dialyse und Gefriertrocknung von PG<sub>EH</sub>-SH-AF680-2 mit ca. 79 % isolierter Ausbeute, PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 mit ca. 55 % Ausbeute sowie PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 mit ca. 25 % Ausbeute, deutet dies darauf hin, dass sich das Edukt im Vergleich zu den anderen Markierungsreaktionen teilweise zu niedermolekularen Bruchstücken zersetzt hat.

#### ***5.1.3.1 Bestimmung des Markierungsgrades durch UV/Vis-Spektroskopie***

Um den Farbstoff-Verlust zu quantifizieren, wurde bei jedem Dialysewasser-Wechsel eine Wasserprobe entnommen, von dieser mit einem UV/Vis-Spektrometer ein Extinktions- bzw. Absorbanzspektrum aufgezeichnet und der Extinktionswert am Anregungsmaximum (646 nm) abgelesen. Anschließend wurde mit Hilfe der für die Konzentrationsbestimmung des an Polymer gebundenen Cy5-Alkins erstellten Kalibriergeraden (Abbildung 11) die Fluoreszenzfarbstoff-Konzentration im Dialysewasser bestimmt. Die Beziehung zwischen der Extinktion und der Cy5-Alkin-Konzentration wird durch die Geradengleichung  $y = 0,26738 x$  beschrieben.



**Abbildung 11:** Kalibriergerade zur Bestimmung der im Dialysewasser / der in einer PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-Lösung befindlichen Cy5-Alkin-Konzentration – basierend auf der Extinktion des Farbstoffs Cy5-Alkin am Anregungsmaximum (Geradengleichung:  $y = 0,26738 x$ )

Tabelle 16 fasst die Resultate zusammen.

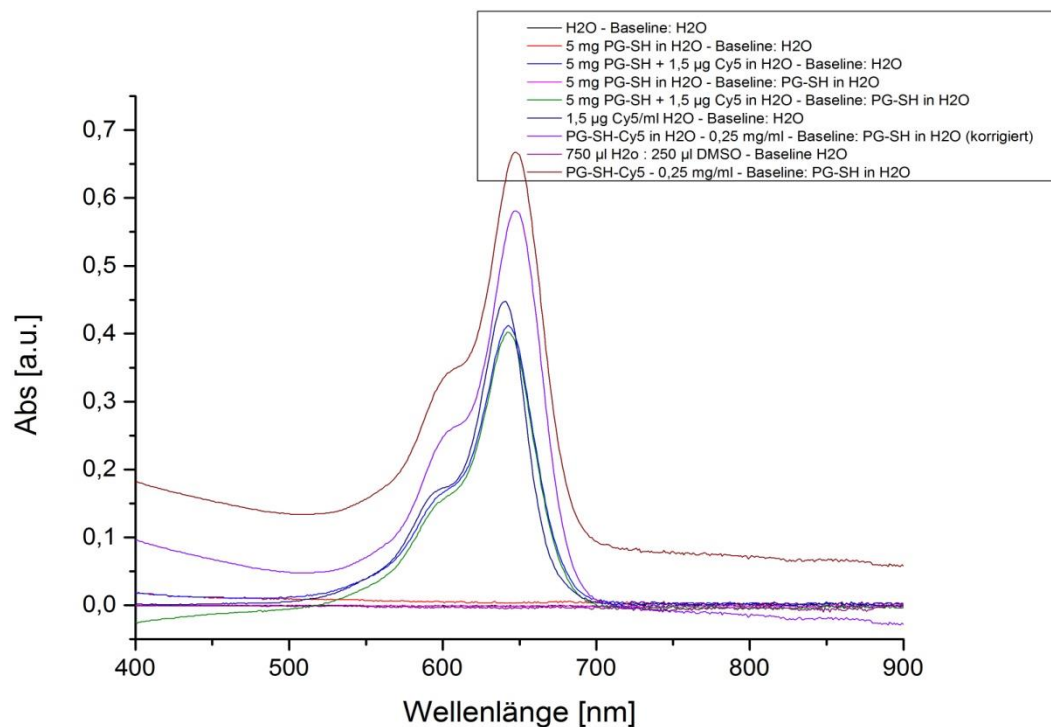
**Tabelle 16:** Cy5-Alkin-Konzentration im Dialysewasser

Probe	Extinktion bei 646 nm [a.u.]	Kalkulierte Cy5-Alkin- Konzentration in der Probe [µg/ml]	Cy5-Gehalt in 2 l Dialysewasser [µg]
1	0,241	0,901	1802
2	0,208	0,778	1556
3	0,019	0,071	142
4	0,007	0,026	52
5	0,016	0,060	120
6	0,008	0,030	60
7	0,004	0,015	30

Während der Aufbereitung des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 sind insgesamt 3,76 mg Cy5-Alkin in freier und gebundener Form aus dem Dialyseschlauch heraus diffundiert, was einem Fluorophor-Verlust von ca. 68 % entspricht. Aufgrund der oben beschriebenen Befunde bei den Markierungsreaktionen über Michael-Additionen kann man davon ausgehen, dass bei der Dialyse (MWCO 1000) der PG-SH-Derivate mit einem mittleren Ausgangs-Molekulargewicht von ca. 5500 - 6600 offensichtlich ein Polymerverlust von ca. 21 – 45 % auftritt. Nimmt man weiterhin an, dass auch bei PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 der Anteil an niedermolekularen Bestandteilen und damit der Verlust von Polymer bei der Dialyse in diesem Bereich liegt, spricht dieses Ergebnis dafür, dass es sich bei dem Fluorophor-Verlust zu einem großen Teil (24 – 48%) um nicht am Polymer gebundenes Cy5-Alkin handelt. Dies würde bedeuten, dass die Umsetzung nur unvollständig und die Reaktionsbedingungen suboptimal waren.

Auch für das Reaktionsprodukt des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 wurde die Konzentration des im Produkt vorhandenen Farbstoffs Cy5-Alkin photometrisch ermittelt. Dafür wurde zunächst ein UV/Vis-Spektrum des mit Cy5-Alkin funktionalisierten Polymers (0,25 mg gelöst in 1 ml Reinstwasser) aufgenommen. Hierbei fällt allerdings auf, dass das gesamte Extinktionsspektrum in positiver Richtung entlang der y-Achse zu höheren Extinktionswerten verschoben ist. Das Spektrum weist im Bereich < 500 nm und > 700 nm eine deutliche residuale Extinktion auf. Auch wiederholte Messungen mit verschiedenen für die Kalibrierung des UV/Vis-Spektrometers verwendeten Proben als Baseline (BL), Lösungsmitteln und Farbstoff-Polymer-Kombinationen (Reinstwasser, DMSO, Wasser-DMSO-Gemisch, 5 mg thiol-funktionalisiertes PG<sub>EF</sub>-SH gelöst in Reinstwasser) änderten nichts an dieser Tatsache. Diese Befunde sprechen dafür, dass in der Probe noch signifikante Mengen an Nebenkomponenten (DMPA oder dessen Zersetzungsprodukte) vorhanden sind. Die nach oben verschobene Baseline des Spektrums spricht dafür, dass die Lösung nicht homogen ist, sondern ungelöste Komponenten vorliegen, die zu einer Abschwächung des bei der Messung verwendeten Lichtstrahls führen. Um zu vermeiden, dass bei der Konzentrationsbestimmung aufgrund des zu positiveren

Werten verschobenen Extinktionsspektrums falsch hohe Cy5-Alkin-Konzentrationen gefunden würden, wurde eine rechnerische Baseline-Korrektur des Extinktionsspektrums durchgeführt. Das Extinktionsspektrum wurde entlang der y-Achse um -0,086 Einheiten verschoben. Das entspricht der mittleren Differenz der Extinktionswerte zwischen der  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5}$ -Lösung (0,25 mg/ml) und einer reinen Cy5-Alkin-Lösung (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 900 nm, 800 nm, 700 nm und 500 nm. Die Differenz der Werte bei 600 nm wurde nicht berücksichtigt, da diese Extinktionswerte im Anregungsbereich des Farbstoffes liegen. Diese Vorgehensweise kann zu einer gewissen Ungenauigkeit bei der Konzentrationsbestimmung führen. In Abbildung 12 sind das Extinktionsspektrum des Reaktionsproduktes, die diversen Vergleichsmessungen und das entlang der y-Achse in den Bereich geringerer Werte korrigierte Extinktionsspektrum von  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  dargestellt.



**Abbildung 12:** Extinktionsspektrum (original und korrigiert) des Reaktionsproduktes des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  (0,25 mg gelöst in 1 ml Wasser) und vergleichende Messungen

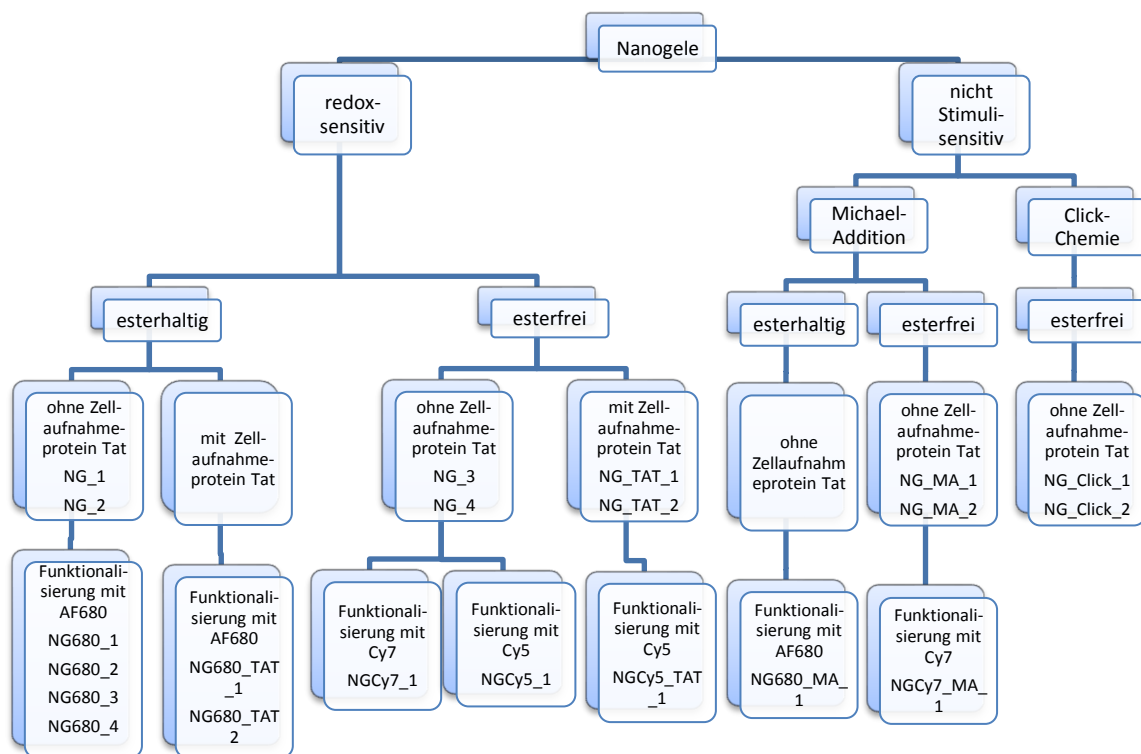


Nach erfolgter Korrektur wurde der am Excitationsmaximum abgelesene Extinktionswert in die Geradengleichung eingesetzt und die Konzentration von Cy5-Alkin berechnet. Die Cy5-Konzentration der gemessenen Probe beträgt 2,17  $\mu\text{g/ml}$ , was 3,90 nmol entspricht. Auf die für die NG-Herstellung verwendete Polymer-Menge von 25 mg hochgerechnet sind das 390 nmol. Verglichen mit den anderen zuvor beschriebenen Methoden zur Funktionalisierung mit einem Fluorophor erweist sich die Funktionalisierung über die UV-induzierte Click-Chemie bezogen auf den Markierungsgrad somit als am vielversprechendsten. Es wurde eine Markierung ca. jeder 10.  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH}$ -Kette erreicht. Bezogen auf den gewünschten Markierungsgrad von 3 wurde ein Umsatz von 31% des eingesetzten Cy5-Alkin zu  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5}$  gefunden. Allerdings besteht bezüglich der Aufreinigung und Ausbeute noch Optimierungsbedarf.

## 5.2 Partikelcharakterisierung

In Abbildung 13 sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NP zusammenfassend aufgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren zur Partikelcharakterisierung angewandt: die Dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Im Folgenden wird detailliert auf die Ergebnisse der Größenbestimmung der für die weiteren Messungen (unter anderem Fluoreszenz-Mikroskopie) verwendeten NP eingegangen.



**Abbildung 13:** Übersicht über die während der Versuchsphase synthetisierten NG

### 5.2.1 DLS - Dynamische Lichtstreuung

Die DLS misst die Streuintensität des an den NP gestreuten Lichts. Dabei ist die Rayleigh-Streuung zu beachten, welche besagt, dass die Intensität  $I$  des Streulichts proportional zur 6. Potenz des Partikeldurchmessers ist ( $I \sim d^6$ ).<sup>[30]</sup> Die Tabellen 17 bis 21 fassen die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung zusammen. Bei den in den Tabellen angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte (3 Zyklen a 5 Minuten).

#### 5.2.1.1 Redox-sensitive Nanopartikel ohne Fluorophor

**Tabelle 17:** DLS-Charakterisierung der redox-sensitiven, nicht gelabelten NP

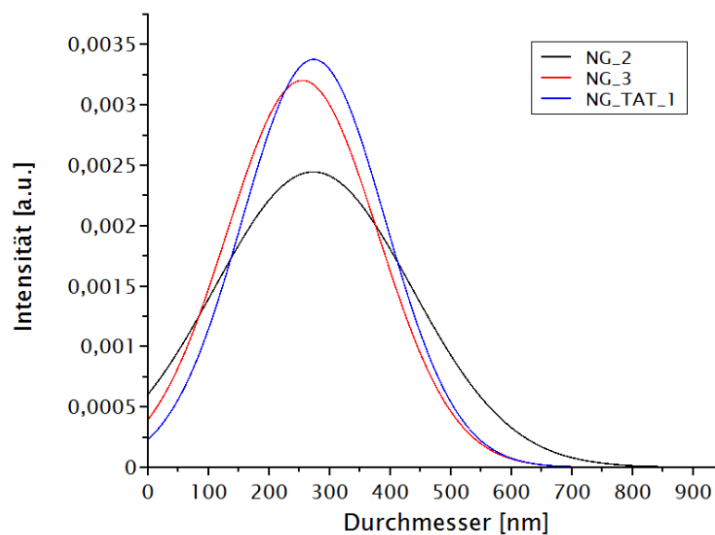
Probe	Größenverteilung		P.I.
	Nach Intensität		
	$d_{\text{mittel}}$ [nm]	SD [nm]	
NG_2	274	163	0,355
NG_3	255	125	0,238
NG_TAT_1	274	118	0,186

In Abbildung 14 sind die Intensitäts-gewichteten Größenverteilungen als Ergebnis der Charakterisierung der unmarkierten, redox-sensitiven NG mit Hilfe der DLS graphisch dargestellt. Dabei handelt es sich um Normalverteilungen nach Gauss.

Die Größenverteilungen fallen für die NG NG\_3 und NG\_TAT\_1 in etwa gleich breit aus. Dabei ist der durchschnittliche Durchmesser von NG\_3 im Vergleich zu NG\_TAT\_1 zu etwas kleineren Werten verschoben. Dieser liegt bei 255 nm  $\pm$  125 nm. Die durchschnittliche Partikelgröße von NG\_TAT\_1 beträgt 274 nm  $\pm$  118 nm. Im Fall von NG\_2 fällt die Größenverteilung etwas breiter aus.

Dabei ist der Durchmesser im Mittel mit einem Wert von  $274 \text{ nm} \pm 163 \text{ nm}$  aber nicht wesentlich größer als für NG\_3 und NG\_TAT\_1.

Bei den Größenverteilungen werden sehr breite Verteilungskurven mit Partikelgrößen bis zu 700 nm gefunden. Dies spricht dafür, dass teilweise größere, die Messung beeinflussende Partikel oder Aggregate vorliegen. Wie bereits unter Punkt 3.3.1 erwähnt worden ist, sollte bei der Intensitäts-gewichteten Größenverteilung die Rayleigh-Näherung beachtet werden, welche besagt, dass die Streuintensität eines Partikels proportional zur 6. Potenz seines Durchmessers ist. Somit besteht die Gefahr, dass insbesondere große Partikel und Aggregate die kleineren Partikel überstrahlen, was dazu führt, dass diese nicht von der DLS detektiert werden können und der durchschnittliche Partikeldurchmesser zu größeren Werten hin verschoben wird. <sup>[30]</sup> Dieser negative Einfluss kann möglicherweise bei zukünftigen Messungen durch eine Filtration der Proben beseitigt werden.



**Abbildung 14:** DLS-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven NG

### 5.2.1.2 Nicht degradierbare Nanopartikel ohne Fluorophor

#### 5.2.1.2.1 Via Michael-Addition hergestellte Nanopartikel

**Tabelle 18:** DLS-Charakterisierung der mit Hilfe des Linkers PEGDA via Michael-Addition hergestellten NP

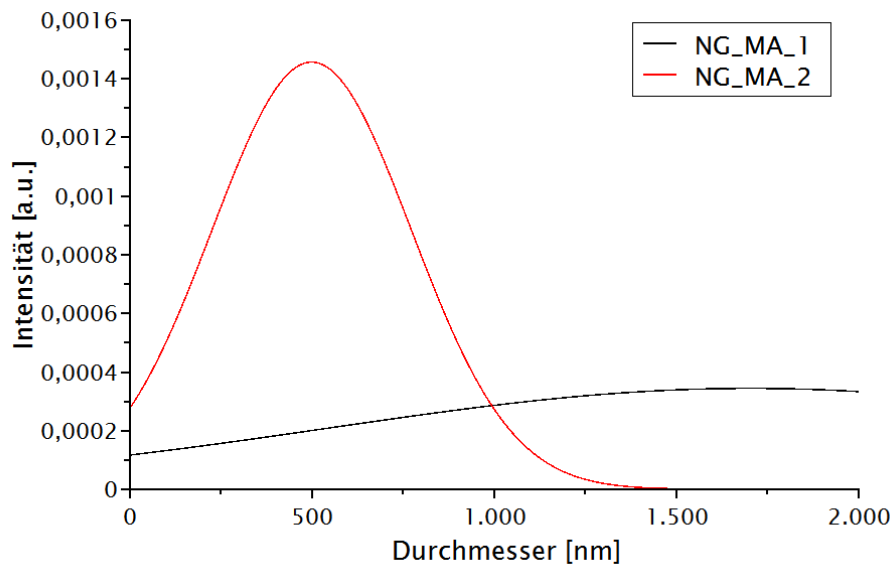
Probe	Größenverteilung		P.I.
	Nach Intensität		
	$d_{\text{mittel}}$ [nm]	SD [nm]	
NG_MA_1	1703	1158	0,462
NG_MA_2	499	274	0,301

In Abbildung 15 sind die Größenverteilungen als Ergebnis der Charakterisierung der unmarkierten, über eine Michael-Addition synthetisierten NP mit Hilfe der DLS graphisch dargestellt. Dabei handelt es sich um Normalverteilungen nach Gauss. Die Messungen erfolgten mit unverdünnten und ungefilterten Proben.

Bei Betrachtung von Abbildung 15 fällt auf, dass die Größenverteilung für NG\_MA\_1 sichtbar breiter ausfällt als für NG\_MA\_2. Im Fall von NG\_MA\_1 (schwarzer Graph) sprengt sie mit einer mittleren Partikelgröße von  $1703 \text{ nm} \pm 1158 \text{ nm}$  sogar den Rahmen der graphischen Darstellung. Der durchschnittliche Partikeldurchmesser ist im Fall von NG\_MA\_2 (roter Graph) hingegen deutlich kleiner und beträgt  $499 \text{ nm} \pm 274 \text{ nm}$ .

Bei diesen Messungen sticht die extrem breite Verteilungskurve, die für NG\_MA\_1 weit über  $1000 \text{ nm}$  reicht, ins Auge. Es ist anzunehmen, dass hier verunreinigende Partikel, insbesondere größere Aggregate in der Probe waren, welche die Messung aufgrund ihrer im Vergleich zu den kleineren NP hohen Streuintensität beeinflusst haben und eine sinnvolle Auswertung verhindern.

Die Ergebnisse sind mit den NTA-Messungen soweit vergleichbar, dass auch dort NG\_MA\_2 eine einheitliche Partikelverteilung mit einem Maximum der NP bei ca. 330 nm aufweist.



**Abbildung 15:** DLS-Partikelcharakterisierung der über Michael-Addition hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

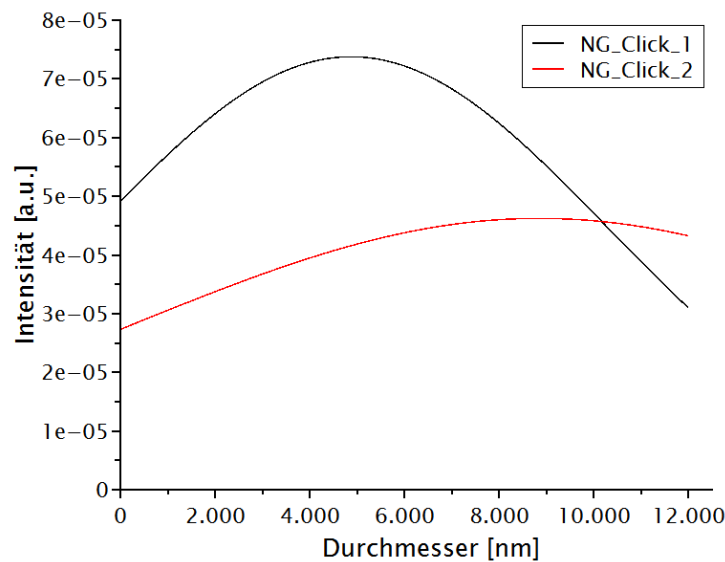
#### 5.2.1.2.2 Via UV-Click-Reaktion hergestellte Nanopartikel

**Tabelle 19:** DLS-Charakterisierung der via UV-Click-Reaktion hergestellten NP

Probe	Größenverteilung		P.I.
	Nach Intensität		
	$d_{\text{mittel}}$ [nm]	SD [nm]	
NG_Click_1	4877	5408	1,23
NG_Click_2	8852	8630	0,951

In Abbildung 16 sind die Größenverteilungen als Ergebnis der mit Hilfe der DLS erfolgten Charakterisierung der unmarkierten, nicht Stimuli-sensitiven NP, die durch eine fotoinitierte UV-Click-Reaktion hergestellt worden sind, graphisch dargestellt. Dabei handelt es sich um Normalverteilungen nach Gauss. Die Messungen erfolgten mit unverdünnten und ungefilterten Proben.

Insgesamt fällt auf, dass die Größenverteilungen beider NP-Lösungen extrem breit ausfallen. Die Verteilungskurven erstrecken sich bis über den Auswertebereich von 12000 nm. Dies spricht dafür, dass in den untersuchten Präparaten Artefakte vorliegen, welche die Messung stören. Die vorliegenden DLS-Messungen erlauben aufgrund ihrer Qualität keine weitergehende Beurteilung zur Charakterisierung der vorliegenden Partikel.



**Abbildung 16:** DLS-Partikelcharakterisierung der via UV-Click-Reaktion hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

### 5.2.1.3 Mit Fluorophor markierte redox-sensitive Nanopartikel

**Tabelle 20:** DLS-Charakterisierung der redox-sensitiven und mit einem Fluorophor gelabelten NP

Probe	Größenverteilung		P.I.
	Nach Intensität		
	$d_{\text{mittel}}$ [nm]	SD [nm]	
NG680_4	352	250	0,503
NG680_TAT_2	329	191	0,336
NGCy5_1	313	280	0,801
NGCy5_TAT_1	131	115	0,759

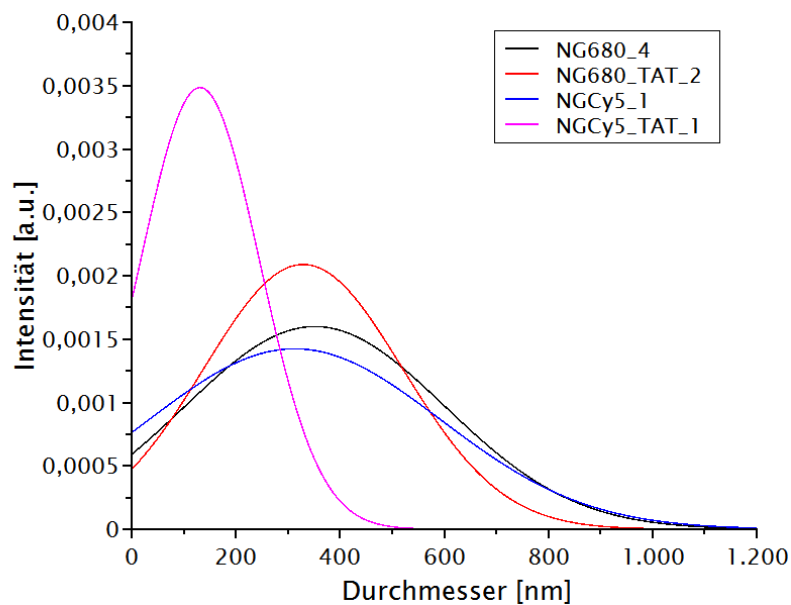
In Abbildung 17 sind die Größenverteilungen als Ergebnis der Charakterisierung der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten, redox-sensitiven NP mit Hilfe der DLS graphisch dargestellt. Dabei handelt es sich um Normalverteilungen nach Gauss. Die Messungen erfolgten mit unverdünnten und ungefilterten Proben.

Die Größenverteilungen zeigen für NG680\_4, NG680\_TAT\_2 und NGCy5\_1 eine vergleichbare Breite. Dabei ist der durchschnittliche Durchmesser von NG680\_TAT\_2 im Vergleich zu NG680\_4 zu etwas kleineren Werten verschoben. Dieser liegt bei  $329 \text{ nm} \pm 191 \text{ nm}$ . Die durchschnittliche Partikelgröße von NG680\_4 beträgt  $352 \text{ nm} \pm 250 \text{ nm}$ . Der mittlere Partikeldurchmesser von NGCy5\_1 ist wiederum geringfügig kleiner als derjenige von NG680\_TAT\_2 ( $313 \text{ nm} \pm 280 \text{ nm}$ ). Für NGCy5\_TAT\_1 fällt die Größenverteilung deutlich schmaler aus. Dabei ist auch der Durchmesser im Mittel mit einem Wert von  $131 \text{ nm} \pm 115 \text{ nm}$  um mehr als die Hälfte kleiner verglichen mit den Werten für NG680\_4, NG680\_TAT\_2 und NGCy5\_1.

Bei den untersuchten redox-sensitiven, markierten NP deutet die Intensitätsgewichtete Größenverteilung auf das Vorliegen von gut definierten Partikeln mit Maxima in der Größenverteilung bei ca. 310 nm – 350 nm bzw. 130 nm hin. Die



relativ breiten Größenverteilungen im Fall von NG680\_4, NG680\_TAT\_2 und NGCy5\_1 lassen aber auch hier auf das Vorhandensein von größeren Partikeln, Aggregaten und Artefakten schließen, die den durchschnittlichen Partikeldurchmesser zu größeren Werten hin verschieben. Der starke Einfluss größerer Partikel auf die DLS-Messungen lässt sich mit der Rayleigh-Näherung erklären ( $I \sim d^6$ ). Übertragen auf die Probe bedeutet das, dass beispielsweise ein 50 nm großer Partikel eine Millionen ( $10^6$ ) mal mehr Licht streut als ein 5 nm großer Partikel, der kleinere Partikel also gegebenenfalls von der DLS nicht detektiert werden kann. [30]



**Abbildung 17:** DLS-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NG-Lösungen

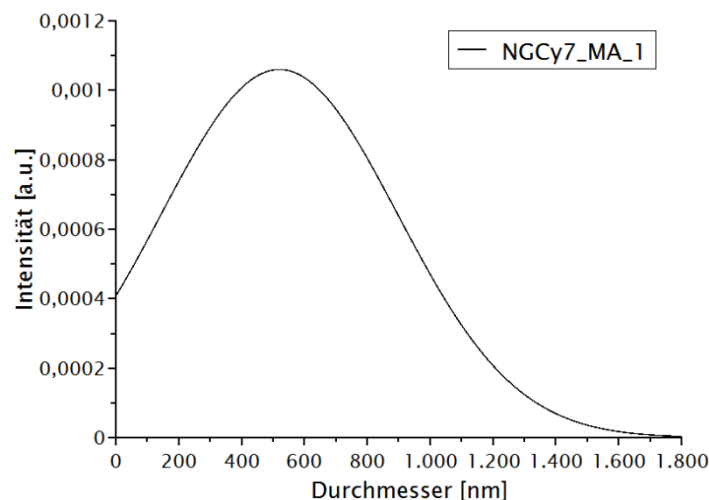
### 5.2.1.4 Mit Fluorophor markierte, nicht degradierbare Nanopartikel

**Tabelle 21:** DLS-Charakterisierung der mit einem Fluorophor markierten, nicht Stimuli-sensitiven NP

Probe	Größenverteilung		P.I.
	Nach Intensität		
	$d_{\text{mittel}}$ [nm]	SD [nm]	
NGCy7_MA_1	521	376	0,523

In Abbildung 18 ist die Größenverteilung als Ergebnis der Charakterisierung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy7 markierten, über eine Michael-Addition synthetisierten NP mit Hilfe der DLS graphisch dargestellt. Auch hier handelt es sich um eine Normalverteilung nach Gauss. Die Messungen erfolgten mit unverdünnten und ungefilterten Proben.

Auf den ersten Blick ist auch hier die extrem breite Größenverteilung deutlich zu erkennen. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt  $521 \text{ nm} \pm 376 \text{ nm}$ . Die Auswertung nach Intensität weist somit dieselben Probleme wie bei den anderen DLS-Messungen auf.



**Abbildung 18:** DLS-Partikelcharakterisierung der nicht Stimuli-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP-Lösung NGCy7\_MA\_1

### 5.2.2 NTA - Nanoparticle Tracking Analysis

Die NTA liefert als Messergebnis einen mittleren Partikeldurchmesser (Mean), die zugehörige Standardabweichung (SD), einen Wert für den Hauptpeak (Mode) und die Partikelkonzentration in Partikel/ml. Das Prinzip der Nanoparticle Tracking Analysis wurde unter Punkt 3.3.2 erläutert.

Die Methode der NTA erlaubt es aus mehreren Messungen einen Mittelwert zu errechnen. Gleiches trifft aber nicht auf die Konzentration zu. Die Begründung hierfür ist in den von Messung zu Messung variierenden Einstellungen des Camera Levels zu suchen. Das Camera Level hat nämlich einen erheblichen Einfluss auf die Anzahl der von der NTA wahrgenommenen Partikel. Somit ist die Konzentration der NG-Lösungen abhängig von der Wahl des Camera Levels. Die Größenbestimmung bleibt hingegen unbeeinflusst, da sich zwar die Anzahl der von der NTA erfassten Partikel, nicht aber die Größe dieser NP ändert. Die NTA-Messungen erfolgten bis auf eine Ausnahme mit verdünnten und gefilterten Proben. Lediglich NG\_3 wurde nicht gefiltert. Die Verdünnungsfaktoren sind in Tabelle 13 aufgeführt.

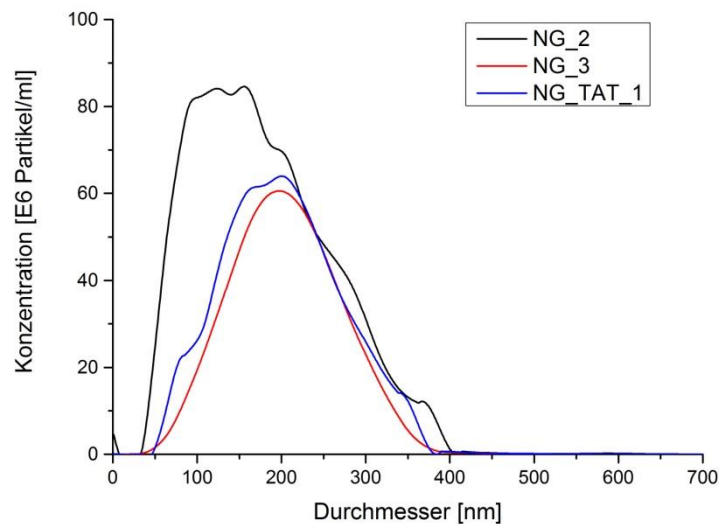
#### 5.2.2.1 Redox-sensitive Nanopartikel ohne Fluorophor

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten redox-sensitiven NP mittels NTA aufgeführt. Während es sich bei den Größenangaben um Mittelwerte, die aus mehreren Messungen pro NG-Probe berechnet worden sind, handelt, entstammen die Konzentrationsangaben jeweils einer einzigen Messung. Die in Tabelle 22 angeführten Konzentrationsangaben wurden aufgrund der in Tabelle 13 angegebenen Verdünnungsfaktoren berechnet und entsprechen somit den Werten in den Ursprungsproben.

**Tabelle 22:** Charakterisierung der redox-sensitiven, nicht gelabelten NP – NTA

Probe	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration aus Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration aus Messung 2 [Partikel/ml]
NG_2	172 ± 38	112 ± 39	103 ± 31	3,9*10 <sup>10</sup>	2,8*10 <sup>10</sup>
NG_3	180 ± 45	149 ± 188	73 ± 0	8,5*10 <sup>11</sup>	7,5*10 <sup>11</sup>
NG_TAT_1	213 ± 4	197 ± 1	82 ± 2	9,7*10 <sup>11</sup>	7,6*10 <sup>11</sup>

In Abbildung 19 ist beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung graphisch dargestellt. Die Graphik verdeutlicht, dass die NG-Lösungen im Fall von NG\_3 und NG\_TAT\_1 eine hohe Konzentration an NP mit einem Durchmesser von ca. 200 nm enthalten. Die aufgrund der Auswertung berechneten Durchschnittsdurchmesser liegen bei ca. 180 nm (NG\_3) bzw. ca. 210 nm (NG\_TAT\_1). Die maximale Größe der Partikel liegt in beiden Fällen bei ca. 375 nm. Die Verteilung von NG\_2 ist insgesamt etwas breiter, deutlich zu erkennen auch an der wesentlich größeren Standardabweichung von ca. 103 nm. Dabei beträgt der durchschnittliche Partikeldurchmesser (Mean) 172 nm. Es ist gut zu erkennen, dass die Größenverteilungen insgesamt relativ schmal sind und die Größe aller in den NG-Lösungen enthaltenen NP deutlich kleiner als 400 nm ist, was für die Reproduzierbarkeit der NG-Synthese spricht und einem wünschenswerten Ergebnis entspricht. Die Konzentration der NP in den Proben lag bei ca. 0,3 - 9,7 \* 10<sup>11</sup> Partikeln/ml. Die Reproduzierbarkeit der Ansätze, die relativ einheitliche und schmale Größenverteilung mit einem Hauptanteil < 300 nm und die recht hohen Partikelkonzentrationen im Bereich von 10<sup>10</sup> bis 10<sup>12</sup> Partikeln/ml unterstreichen das Potential dieses Typs von NG für biologische Anwendungen.



**Abbildung 19:** NTA-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, nicht markierten NP

#### 5.2.2.2 Nicht Stimuli-sensitive Nanopartikel ohne Fluorophor

Als nicht Stimuli-sensitive NP werden Partikel bezeichnet, die nicht auf einen bestimmten Stimulus (Temperatur, pH-Abfall, etc.) hin zerfallen. Diese Arbeit diente unter anderem auch dem Versuch, ein nicht Stimuli-sensitives NP-System aus quervernetzten PG-SH zu entwickeln, welches sowohl für in vitro- als auch für in vivo-Untersuchungen geeignet ist. Die Partikelcharakterisierung spielt bei der Etablierung eines solchen Systems eine bedeutende Rolle, da sie einen ersten Anhaltspunkt dafür liefert, ob bei der Synthese geeignete NP mit einem durchschnittlichen Durchmesser unter 300 nm in ausreichender Konzentration entstehen.

Bei der Synthese nicht Stimuli-sensitiver NP aus  $PG_{EF-SH}$  wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde  $PG_{EF-SH}$  über eine Michael-Addition mit Hilfe des Linkers PEGDA quervernetzt. Im zweiten Ansatz erfolgte die Herstellung der NP aus  $PG_{EF-SH}$  und  $PG-stat-AGE$  über eine fotoinitierte UV Click-Reaktion. In den folgenden Unterkapiteln sind die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung tabellarisch und graphisch dargestellt.

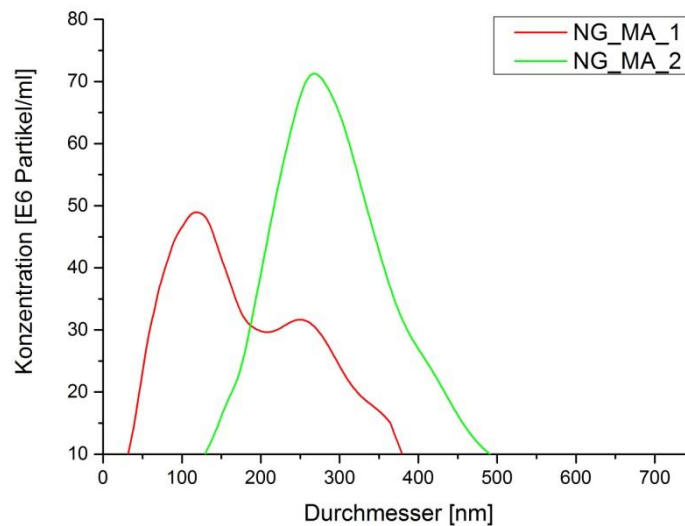
### 5.2.2.2.1 Via Michael-Addition hergestellte Nanopartikel

Tabelle 23 fasst die Ergebnisse der Charakterisierung der nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, via Michael-Addition hergestellten NP mittels NTA zusammen. Auch hier handelt es sich bei den Größenangaben um Mittelwerte, die aus mehreren Messungen pro NG-Probe berechnet worden sind. Die Konzentrationsangaben sind das jeweilige Ergebnis einer einzigen Messung. Die angegebenen Konzentrationen wurden aufgrund der in Tabelle 13 angegebenen Verdünnungsfaktoren hochgerechnet und entsprechen somit den Werten in den Ursprungsproben.

**Tabelle 23:** Charakterisierung der mit Hilfe des Linkers PEGDA via Michael-Addition hergestellten NP – NTA

Probe	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration Messung 2 [Partikel/ml]
NG_MA_1	180 ± 32	91 ± 31	117 ± 19	2,8*10 <sup>10</sup>	4,8*10 <sup>10</sup>
NG_MA_2	331 ± 42	270 ± 27	168 ± 39	5,3 *10 <sup>10</sup>	6,1*10 <sup>10</sup>

In Abbildung 20 ist beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt ein deutlich unterschiedliches Größenspektrum für die beiden Ansätze NG\_MA\_1 und NG\_MA\_2. Während NG\_MA\_1 eine bimodale Größenverteilung mit Maxima bei ca. 130 nm und 260 nm aufweist, weist die Größenverteilung von NG\_MA\_2 lediglich ein Maximum bei ca. 300 nm auf. Dabei ist die Größenverteilung von NG\_MA\_2 insgesamt zu etwas höheren Werten (331 nm ± 168 nm) verschoben verglichen mit NG\_MA\_1 (180 nm ± 117 nm). Die monomodale Größenverteilung von NG\_MA\_2 lässt den Schluss zu, dass es sich bei NG\_MA\_2 um eine einheitlichere, homogenere NG-Spezies mit einer besser definierten Partikelgröße handelt. Die Teilchenkonzentrationen liegen für beide Ansätze bei ca. 3 - 6 x 10<sup>10</sup> Partikeln/ml, wobei die Werte für NG\_MA\_2 etwas höher liegen. Die graphisch dargestellten Messungen unterstreichen somit die in Tabelle 23 zusammengefassten Ergebnisse.



**Abbildung 20:** NTA-Partikelcharakterisierung der über eine Michael-Addition hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

#### 5.2.2.2.2 Via UV-Click-Reaktion hergestellte Nanopartikel

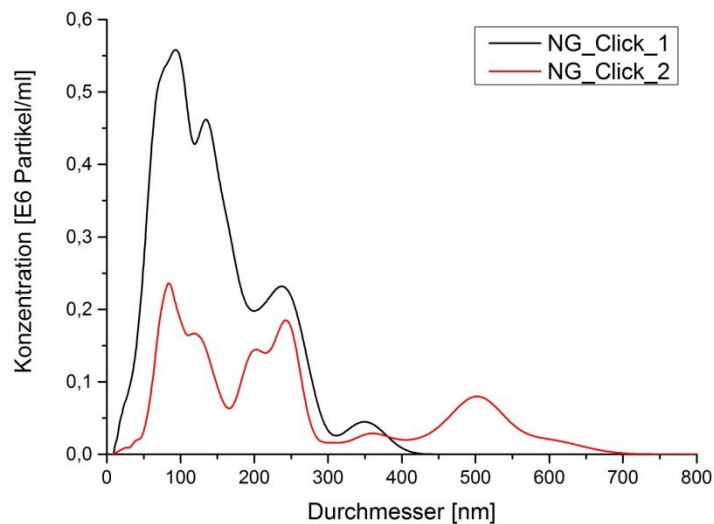
Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung der über eine licht-induzierte UV-Click-Reaktion hergestellten NP mittels NTA zu entnehmen. Die Größenangaben sind Mittelwerte, die aus mehreren Messungen pro NG-Probe berechnet worden sind. Die Konzentrationsangaben sind das jeweilige Ergebnis einer einzigen Messung. Die dargestellten Konzentrationen wurden aufgrund der in Tabelle 13 angegebenen Verdünnungsfaktoren berechnet und entsprechen somit den Werten in den Ursprungsproben.

**Tabelle 24:** Charakterisierung der via UV-Click-Reaktion hergestellten NP – NTA

Probe	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration Messung 2 [Partikel/ml]
NG_Click_1	128 ± 28	69 ± 41	82 ± 63	4,0*10 <sup>9</sup>	4,5*10 <sup>8</sup>
NG_Click_2	184 ± 59	104 ± 78	103 ± 45	2,1 *10 <sup>9</sup>	5,8 *10 <sup>8</sup>

In Abbildung 21 ist beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung graphisch dargestellt. Beide Ansätze weisen bei der NTA-Messung eine wesentlich breitere Partikelgrößenverteilung mit mehreren Maxima als die bisher beschriebenen NG-Lösungen auf. Es fällt auf, dass die Größenverteilung der in NG\_Click\_2 enthaltenen NP im Vergleich zu NG\_Click\_1 sichtlich breiter ist. Diese Feststellung wird durch den größeren Durchschnittsdurchmesser ( $184 \text{ nm} \pm 59 \text{ nm}$ ) und die größere Standardabweichung ( $103 \text{ nm} \pm 45 \text{ nm}$ ) von NG\_Click\_2 verglichen mit NG\_Click\_1 unterstrichen. Die Durchmesser der einzelnen Partikel bewegen sich im Fall von NG\_Click\_1 im Bereich von 10 nm bis 410 nm, im Fall von NG\_Click\_2 im Bereich von 10 nm bis 700 nm. Während NG\_Click\_1 einen deutlichen Hauptpeak bei ungefähr 120 nm aufweist, sind für NG\_Click\_2 drei Spitzenwerte ausmachbar. Der erste und höchste Peak liegt bei ca. 90 nm, der zweite Peak ist bei ca. 250 nm zu erkennen. Der dritte und niedrigste Peak erhebt sich bei ca. 500 nm. Die Konzentration an in den Proben vorhandenen NP beträgt im Fall von NG\_Click\_2 nur etwa ein Drittel bis zur Hälfte der Konzentration von NG\_Click\_1. Die Ergebnisse der NTA-Messung weisen auf eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit der UV-Click-Reaktion hin, die zudem zu schlecht definierten, uneinheitlichen und relativ großen NP führt. Da außer der Aufarbeitung weitgehend identische Reaktionsbedingungen bei der Herstellung der beiden Chargen angewandt wurden, ist dieser Befund ohne weitere Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit schlecht zu interpretieren. Auch die gemessene Partikelkonzentration im Bereich von  $10^8$  bis  $10^9$  Partikeln/ml liegt um ein bis zwei Größenordnungen unter den bei den anderen NG-Lösungen gemessenen Konzentrationen. Aufgrund der großen Differenzen in der Größenverteilung und Konzentration zwischen den beiden NG-Lösungen ist aktuell nicht von einer zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit der NP-Synthese über eine fotoinitierte UV-Click-Reaktion auszugehen. Sollte dieser Syntheseweg weiterverfolgt werden, bedarf dies einer Optimierung der Reaktionsbedingungen.





**Abbildung 21:** NTA-Partikelcharakterisierung der durch UV-Click-Reaktion hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

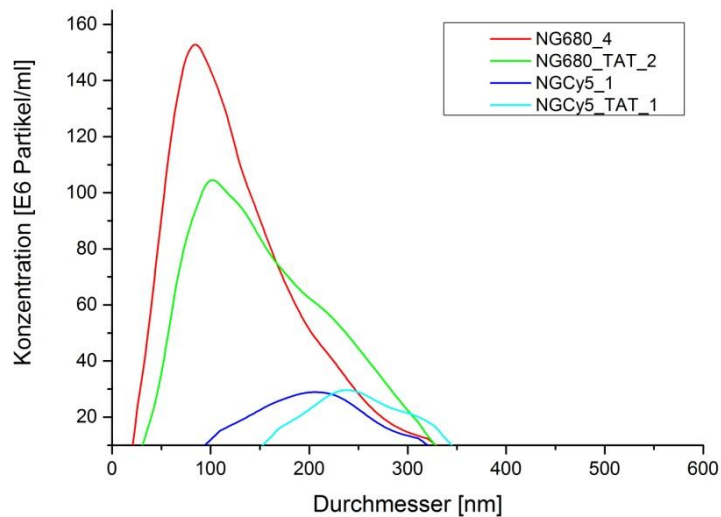
### 5.2.2.3 Mit Fluorophor markierte redox-sensitive Nanopartikel

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten redox-sensitiven NP mittels NTA aufgeführt. Während es sich bei den Größenangaben um Mittelwerte, die aus mehreren Messungen pro NG-Probe berechnet worden sind, handelt, entstammen die Konzentrationsangaben jeweils einer einzigen Messung. Die angegebenen Konzentrationen wurden aufgrund der in Tabelle 13 angegebenen Verdünnungsfaktoren berechnet und entsprechen somit den Werten in den Ursprungsproben.

**Tabelle 25:** Charakterisierung der redox-sensitiven und mit einem Fluorophor gelabelten NP – NTA

Probe	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration Messung 2 [Partikel/ml]
NG680_4	149 ± 18	101 ± 17	74 ± 5	6,5*10 <sup>10</sup>	8,8*10 <sup>10</sup>
NG680_TAT_2	158 ± 14	93 ± 9	75 ± 3	9,3 *10 <sup>10</sup>	5,5 *10 <sup>10</sup>
NGCy5_1	242 ± 17	200 ± 21	122 ± 20	5,0*10 <sup>9</sup>	9,3*10 <sup>9</sup>
NGCy5_TAT_1	305 ± 40	237 ± 24	140 ± 19	8,5*10 <sup>9</sup>	9,3*10 <sup>9</sup>

In Abbildung 22 ist beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt anschaulich, dass die NG-Lösungen NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 mit ca. 6 - 9 x 10<sup>10</sup> Partikeln/ml eine um ca. den Faktor 10 höhere Partikelkonzentration aufweisen als die NG NGCy5\_1 und NGCy5\_TAT\_1 (ca. 5 - 9 x 10<sup>9</sup> Partikel/ml). Die Partikelgrößenverteilungen von allen vier Proben sprechen mit jeweils einem Peak in der Verteilung für eine relativ gute Reproduzierbarkeit und das Vorliegen von relativ einheitlichen NG-Spezies. Bei den mit dem Fluorophor Alexa Fluor 680 markierten NP liegt eine etwas breitere Größenverteilung vor als bei den mit Cy5 markierten Partikeln. Für NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 bewegen sich die gemessenen Partikeldurchmesser zwischen 25 nm und 325 nm. Im Fall von NGCy5\_1 haben die kleinsten NP einen Durchmesser von ca. 100 nm, der Durchmesser der größten Partikel beträgt ungefähr 325 nm. Die in der NG-Lösung NGCy5\_TAT\_1 vorhandenen Partikel sind geringfügig größer. Die mit Hilfe der NTA ermittelten Partikeldurchmesser liegen in einem Bereich von 150 nm bis 350 nm. Für alle 4 Proben gilt, dass die einzelnen NP im Durchmesser kleiner als 350 nm sind. In den NG-Lösungen NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 ist eine hohe Konzentration an NP mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm auszumachen. Für NGCy5\_1 liegt der Hauptpeak bei ca. 200 nm, für NGCy5\_TAT\_1 bei ca. 240 nm. Insgesamt sind diese NG aufgrund ihrer reproduzierbaren einheitlichen Größenverteilung mit einem Hauptanteil < 300 nm und der relativ hohen Partikelkonzentration als aussichtsreiche Kandidaten für weitere Untersuchungen zu werten.



**Abbildung 22:** NTA-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

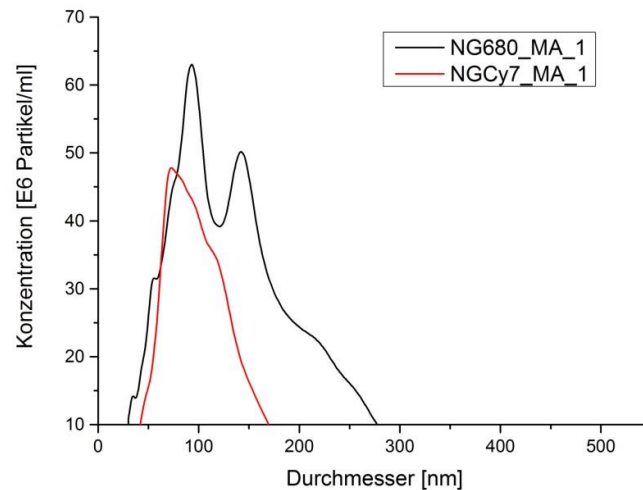
#### 5.2.2.4 Mit Fluorophor markierte, nicht Stimuli-sensitive Nanopartikel (Michael-Addition)

Tabelle 26 fasst die Ergebnisse der Charakterisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, nicht Stimuli-sensitiven NP mittels NTA zusammen. Bei der Herstellung markierter, nicht Stimuli-sensitiver Partikel kam lediglich die Synthese via Michael-Addition zum Einsatz. Die in der Tabelle angegebenen Durchmesser sind Mittelwerte, die aus mehreren Messungen pro NG-Probe kalkuliert worden sind. Bei den Konzentrationsangaben hingegen handelt es sich um das jeweilige Ergebnis einer einzigen Messung. Die aufgeführten Konzentrationen wurden aufgrund der in Tabelle 13 angegebenen Verdünnungsfaktoren berechnet und entsprechen somit den Werten in den Ursprungsproben.

**Tabelle 26:** Charakterisierung der mit einem Fluorophor markierten nicht degradierbaren NP – NTA

Probe	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration Messung 2 [Partikel/ml]
NG680_MA_1	165 ± 7	94 ± 1	105 ± 11	1,4*10 <sup>10</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
NGCy7_MA_1	118 ± 17	70 ± 10	60 ± 15	3,5 *10 <sup>10</sup>	5,7 *10 <sup>10</sup>

Abbildung 23 zeigt beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung. Der Graphik ist zu entnehmen, dass es sich bei den mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 markierten NP NG680\_MA\_1 aufgrund der gemessenen bimodalen Größenverteilung nicht um eine einheitliche Spezies handelt. Die Größe der in der NG-Lösung NG680\_MA\_1 vorhandenen Partikel liegt bei 165 nm ± 105 nm, was den Anforderungen des gewünschten Einsatzgebiets entspräche. Die Partikelkonzentration liegt mit ca. 2 x 10<sup>10</sup> Partikeln/ml im Bereich der für die anderen NG gefundenen Werte. NGCy7\_MA\_1 weist in den NTA-Messungen eine weitgehend einheitliche Verteilung um ein Maximum von ca. 70 nm, einem Durchschnittsdurchmesser von ca. 120 nm und keine signifikanten Anteile > 170 nm bei Partikelkonzentrationen um 6 x 10<sup>10</sup> Partikeln/ml auf und erscheint somit für weitere Untersuchungen attraktiv.



**Abbildung 23:** NTA-Partikelcharakterisierung der nicht Stimuli-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP

### 5.3 Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen

Die für pharmazeutische Zwecke eingesetzten NP können auf unterschiedlichen Wegen (intravenös, oral, etc.) in den Organismus gelangen, dürfen ihren Wirkstoff aber erst am Zielort, bzw. im Zielorgan freisetzen. Deshalb ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass die NP unter physiologischen Bedingungen bei 37°C weitestgehend stabil sind und so die Wirkstoffabgabe erst am Bestimmungsort stattfinden kann. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der In-vitro-Stabilitätsexperimente für die redox-sensitiven und die nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition hergestellten NP aufgeführt. Die für die Stabilitätsexperimente verwendeten NP wurden alle aus esterfreiem PG<sub>EF</sub>-SH synthetisiert, so dass ein möglicher Einfluss des eingesetzten Polymers auf die Stabilität der NP nahezu ausgeschlossen werden kann. Die Bestimmung der Partikelgröße und der Partikelkonzentration erfolgte mit Hilfe der NTA.

### 5.3.1 Größenverteilung

Ein Indiz für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen ist eine über einen längeren Zeitraum konstanter Partikeldurchmesser. Mit Hilfe der NTA wurde der mittlere Durchmesser (Mean), der höchste Peak (Mode) und die Standardabweichung (SD) zum Zeitpunkt 0, nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 7 Tagen und 14 Tagen ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt fanden mehrere Messungen statt. Die aus den jeweiligen Messungen gemittelten Werte für die redox-sensitiven NP sind in Tabelle 27 aufgeführt und in Abbildung 24 graphisch dargestellt. Tabelle 28 und Abbildung 25 zeigen die mittleren Messergebnisse für die nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition hergestellten NP.

Grundsätzlich konnten während des gesamten Zeitraums von 14 Tagen, in dem die Messungen erfolgt sind, weder für das redox-sensitive NG noch für das nicht Stimuli-sensitive NG sichtbare Veränderungen des Aussehens beobachtet werden. Eine Sedimentation, das heißt ein Absetzen der NP, fand nicht statt. Auch eine mit den Augen wahrnehmbare Aggregatbildung konnte nicht registriert werden.

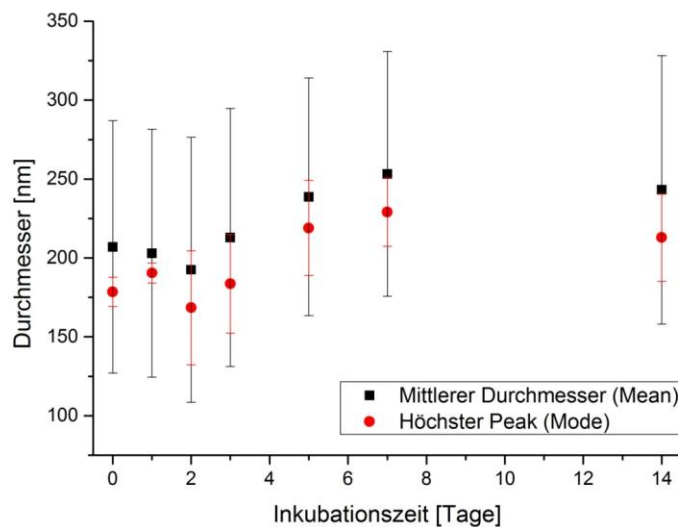
**Tabelle 27:** Partikeldurchmesser der redox-sensitiven NP (NG\_3) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

Inkubationszeit	Mean [nm]	Mode [nm]	Standardabweichung [nm]
<b>0 h / 0 d</b>	207 ± 6	179 ± 9	80 ± 9
<b>24 h / 1 d</b>	203 ± 1	191 ± 6	79 ± 1
<b>48 h / 2 d</b>	193 ± 33	169 ± 36	84 ± 6
<b>72 h / 3 d</b>	213 ± 26	184 ± 31	82 ± 0
<b>120 h / 5 d</b>	239 ± 23	219 ± 30	75 ± 3
<b>7 d</b>	253 ± 19	229 ± 22	78 ± 5
<b>14 d</b>	243 ± 17	213 ± 28	85 ± 8

Abbildung 24 zeigt anschaulich, dass die untersuchten redox-sensitiven NP über den Zeitraum von mehreren Tagen unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Weiterhin könnten die Messergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass sowohl der mittlere Partikeldurchmesser (Mean) als auch der Durchmesser

des höchsten Peaks (Mode) im Fall der redox-sensitiven NP über die ersten sieben Tage zunimmt. Der anschließende Verlauf der Messungen könnte sowohl als Plateau ohne weitere Veränderung oder evtl. als geringfügige Alterung interpretiert werden. Es ist eine Größenzunahme des mittleren Partikeldurchmessers im Schnitt um 36 nm zu verzeichnen, während der Wert des höchsten Peaks sich um 35 nm vergrößert. Damit bewegt sich die Größenzunahme nahezu im Bereich der Standardabweichung. Das bedeutet, dass zwar eine Größenzunahme der NP festgestellt werden kann, diese aber statistisch nicht signifikant ausfällt, was bei der Interpretation der Ergebnisse Beachtung finden muss.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Vergrößerung des Partikeldurchmessers sich vor allem in den ersten 7 Tagen vollzieht. Der mittlere NP-Durchmesser nimmt zwischen Tag 0 und Tag 7 um ca. 46 nm zu, der Diameter des höchsten Peaks um ca. 51 nm. In der zweiten Woche (Tag 7-14) verringert sich der Durchmesser wieder etwas (Mean: -10 nm, Mode: -16 nm).



Tag 1-14 →  $\Delta$  Durchmesser (Mean): **+36 nm**

**Abbildung 24:** Größenverteilung der redox-sensitiven NP (NG\_3) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

Nachfolgend fassen Tabelle 28 und Abbildung 25 die Ergebnisse des Stabilitätsexperiments, die Partikelgröße betreffend, für die nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP zusammen.

**Tabelle 28:** Partikeldurchmesser der nicht redox-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP (NG\_MA\_1) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

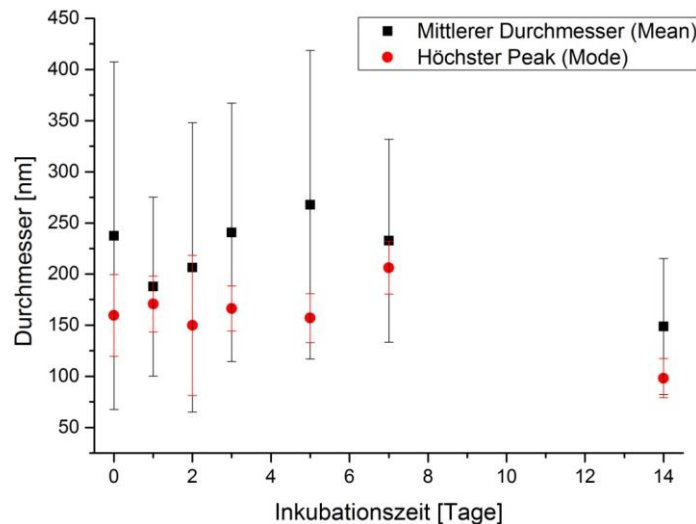
Inkubationszeit	Mean [nm]	Mode [nm]	Standardabweichung [nm]
<b>0 h / 0 d</b>	238 ± 28	160 ± 40	170 ± 16
<b>24 h / 1 d</b>	188 ± 13	171 ± 27	88 ± 7
<b>48 h / 2 d</b>	206 ± 7	150 ± 68	141 ± 19
<b>72 h / 3 d</b>	241 ± 31	166 ± 22	126 ± 26
<b>120 h / 5 d</b>	268 ± 30	157 ± 24	151 ± 65
<b>7 d</b>	232 ± 24	206 ± 26	99 ± 16
<b>14 d</b>	149 ± 33	98 ± 19	67 ± 11

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass der Partikeldurchmesser für die ersten sieben Tage innerhalb der Fehlerbreite praktisch konstant bleibt. Die zwischen Tag 7 und 14 beobachtete Abnahme des mittleren Durchmessers von ca. 240 nm (durchschnittliche Größe von Tag 1 bis 7) auf ca. 150 nm ist signifikant. Um diese Größenabnahme zu erklären, sollte der für die Vernetzung von PGEF/EH-SH eingesetzte Linker PEGDA genauer betrachtet werden. Dieser enthält einen Ester, welcher durch Hydrolyse abgebaut wird, was letztendlich im Zerfall der NP und somit in kleineren Partikeldurchmessern resultiert. Sowohl der mittlere Partikeldurchmesser (Mean) als auch der Durchmesser des höchsten Peaks (Mode) nimmt im Fall der nicht Stimuli-sensitiven NP über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen ab. Dabei verringert sich der mittlere Partikeldurchmesser im Schnitt um ca. 89 nm, während der Wert des höchsten Peaks sich um ca. 61 nm verkleinert.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass der mittlere Partikeldurchmesser in den ersten 7 Tagen merklichen Schwankungen unterliegt. Über den Zeitraum von 7 Tagen gesehen nimmt er nur minimal ab (-5 nm). Auch der Durchmesser des höchsten Peaks schwankt in den ersten 5 Tagen erheblich, zwischen Tag 5 und



Tag 7 ist dann aber letztendlich eine deutliche Größenzunahme um ca. 49 nm zu verzeichnen. Die Verkleinerung des Diameters erfolgt für beide Messgrößen hauptsächlich zwischen den Tagen 7 und 14. Der mittlere Partikeldurchmesser verringert sich deutlich um 84 nm, der Durchmesser des höchsten Peaks sogar um 108 nm.



Tag 1-14 →  $\Delta$  Durchmesser (Mean): **-89 nm**

**Abbildung 25:** Größenverteilung der nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP (NG\_MA\_1) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

### 5.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der in einer NG-Lösung enthaltenen NP ist ein weiteres Indiz für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen. Eine konstante Partikelkonzentration spricht für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen, während eine Abnahme der Partikelkonzentration Hinweise auf einen Abbau oder Zerfall der NP geben kann. Mit Hilfe der NTA wurde die Konzentration der in den Proben enthaltenen NP zum Zeitpunkt 0, nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 7 Tagen und 14 Tagen ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt fanden

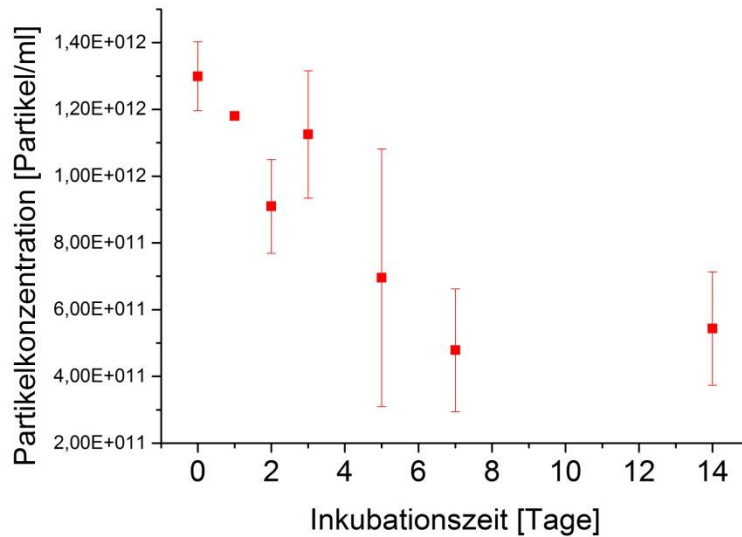
mehrere Messungen statt. Die aus den jeweiligen Messungen gemittelten Werte für die redox-sensitiven NP sind in Tabelle 29 aufgeführt und in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Tabelle 30 und Abbildung 27 zeigen die gemittelten Messergebnisse für die nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition hergestellten NP.

**Tabelle 29:** Partikelkonzentration der redox-sensitiven NP (NG\_3) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

Inkubationszeit	Partikelkonzentration [Partikel/ml]
0 h / 0 d	$1,3 \cdot 10^{12} \pm 1,0 \cdot 10^{11}$
24 h / 1 d	$1,2 \cdot 10^{12} \pm 4,8 \cdot 10^9$
48 h / 2 d	$9,1 \cdot 10^{11} \pm 1,4 \cdot 10^{11}$
72 h / 3 d	$1,1 \cdot 10^{12} \pm 1,9 \cdot 10^{11}$
120 h / 5 d	$7,0 \cdot 10^{11} \pm 3,9 \cdot 10^{11}$
7 d	$4,8 \cdot 10^{11} \pm 1,8 \cdot 10^{11}$
14 d	$5,4 \cdot 10^{11} \pm 1,7 \cdot 10^{11}$

Der Graphik in Abbildung 26 kann entnommen werden, dass die Konzentration der in der Probe befindlichen redox-sensitiven NP konstant über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen um ca. 60 % abnimmt ( $-7,6 \cdot 10^{11}$  Partikel/ml). Zwischen den Tagen 7 und 14 ist ein leichter Anstieg der Konzentration zu verzeichnen. Bei den oben beschriebenen Stabilitätsversuchen der redox-sensitiven NP wurde festgestellt, dass die Teilchengröße im Verlauf des Versuches tendenziell ansteigt. Die Frage ist, ob dies auf Kosten der Teilchenanzahl erfolgt. Berechnet man aus Teilchenanzahl und Teilchendurchmesser das Gesamtvolumen der in der Probe vorliegenden NP, so stellt man fest, dass dieses Gesamtvolumen im Verlauf von 14 Tagen um ca. 30 % abnimmt (Gesamtpartikelvolumen an Tag 0:  $1,15 \times 10^{19} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ; Gesamtpartikelvolumen an Tag 14:  $7,82 \times 10^{18} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ). Diese Art der Auswertung der Versuchsergebnisse zeigt weiterhin, dass es sich bei den Messwerten nach 2 Tagen um einen Ausreißer handeln muss. Der Befund, dass die Partikelkonzentration im Verlauf der Untersuchung um ca. 60% abnimmt während gleichzeitig das Gesamtvolumen der in der Probe

vorliegenden NP lediglich um 30% abnimmt, untermauert weiterhin, dass bei den untersuchten redox-sensitiven Partikeln eine gewisse Alterung mit gleichzeitiger Vergrößerung der Partikel aufgrund vorhandener freier Thiole stattfindet.



Tag 1-14 →  $\Delta$ Konzentration: **-58,5 %**

**Abbildung 26:** Partikelkonzentration der redox-sensitiven NP (NG\_3) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

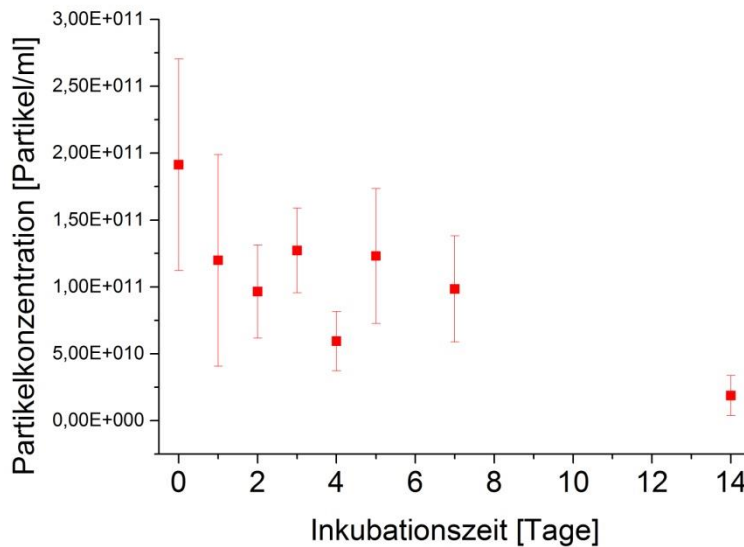
Nachfolgend fassen Tabelle 30 und Abbildung 27 die Ergebnisse des Stabilitätsexperiments, die Partikelkonzentration betreffend, für die nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP zusammen.

**Tabelle 30:** Partikelkonzentration der nicht redox-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP (NG\_MA\_1) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

Inkubationszeit	Partikelkonzentration [Partikel/ml]
0 h / 0 d	$1,9 \cdot 10^{11} \pm 7,9 \cdot 10^{10}$
24 h / 1 d	$1,2 \cdot 10^{11} \pm 7,9 \cdot 10^{10}$
48 h / 2 d	$9,7 \cdot 10^{10} \pm 3,5 \cdot 10^{10}$
72 h / 3 d	$1,3 \cdot 10^{11} \pm 3,2 \cdot 10^{10}$
120 h / 5 d	$1,2 \cdot 10^{11} \pm 5,0 \cdot 10^{10}$
7 d	$9,9 \cdot 10^{10} \pm 4,0 \cdot 10^{10}$
14 d	$1,9 \cdot 10^{10} \pm 1,5 \cdot 10^{10}$

Abbildung 27 zeigt, dass die Konzentration der in der Probe befindlichen nicht Stimuli-sensitiven NP über den gesamten Versuchszeitraum wesentlich stärker abnimmt ( $-1,7 \cdot 10^{11}$  Partikel/ml bzw. um 90 % nach 14 Tagen) als die entsprechende Konzentration der redox-sensitiven NP. Eine erste Verringerung der Partikelkonzentration findet bereits zwischen Tag 0 und Tag 1 statt ( $-7,0 \cdot 10^{10}$  Partikel/ml), die zweite Abnahme erfolgt dann zwischen den Tagen 7 und 14. Dabei verringert sich die Partikelkonzentration noch einmal um  $8,0 \cdot 10^{10}$  Partikel/ml. Berechnet man das Gesamtvolumen der in der Probe vorliegenden Partikel, sieht man, dass dieses sich nach 7 Tagen praktisch halbiert hat (Gesamtpartikelvolumen an Tag 0:  $1,35 \times 10^{18} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ; Gesamtpartikelvolumen an Tag 7:  $6,49 \times 10^{17} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ). Aufgrund der Auswertung scheint es sich bei den Messergebnissen nach 1 und 2 Tagen um Ausreißer zu handeln. Es ist nicht plausibel, dass sich die Anzahl bzw. das Gesamtvolumen der Partikel ohne äußeren Einfluss verringert und anschließend spontan wieder ansteigt.

Eine Erklärung für das Ergebnis, dass die Konzentration der nicht Stimuli-sensitiven NP bei längerer Inkubation deutlich drastischer abnimmt als die Konzentration der redox-sensitiven NP, ist in der Verwendung von PEGDA als Linker zu suchen. PEGDA, das im Fall der nicht Stimuli-sensitiven NP für die Vernetzung der  $\text{PG}_{\text{EF/EH-SH}}$ -Moleküle sorgt, enthält einen Ester. Dieser Ester kann in wässriger Umgebung, beispielsweise in einem physiologischen Medium, durch Hydrolyse gespalten werden, was zur Degradierung der NP und schließlich in der Konsequenz zu einer Abnahme der Konzentration führt. Die beobachteten Ausreißer bei der Messung deuten darauf hin, dass es bei längerem Stehen zu ungleichmäßigen Verteilungen im Medium kommen kann, so dass bei der Probenahme keine für das Gesamtmessgut repräsentative Probe erhalten wird.



Tag 1-14 →  $\Delta$ Konzentration: **-90 %**

**Abbildung 27:** Partikelkonzentration der nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP (NG\_MA\_1) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C

#### 5.4 Wechselwirkungen zwischen redox-sensitiven Nanopartikeln und Bovinem Serumalbumin

Nach Applikation in einen biologischen Organismus sind die NP unter anderem den unterschiedlichen Bestandteilen des Blutes ausgesetzt. Zu diesen zählen die zellulären Bestandteile (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) und das Blutplasma. Beim Blutplasma handelt es sich um eine wässrige Lösung, welche Proteine, Salze und niedrig-molekulare Stoffe enthält. Es gibt bereits zahlreiche Studien, die gegenseitige Wechselwirkungen von Proteinen mit NP belegen. [81] [82] [83] Dabei kann sich eine potentielle Interaktion beispielsweise nachteilig auf die zelluläre Aufnahme von NP auswirken, sollten die NP durch Proteine maskiert und so den typischen Zellaufnahmemechanismen nicht mehr zugänglich sein. Denkbar ist auch ein frühzeitiger Abbau, speziell der redox-sensitiven NP durch den Kontakt mit Serumalbumin, da dieses einen hohen Gehalt an der Aminosäure Cystein (insgesamt 35 Cystein-Reste) hat. Cystein wiederum ist in

der Lage mit einem zweiten Cystein-Molekül Disulfid-Brücken auszubilden. Die Tertiärstruktur von Serumalbumin wird durch 14 solcher Disulfidbrücken stabilisiert. Das durch Oxidation zweier Cystein-Moleküle entstandene Disulfid wird auch als Cystin bezeichnet. Allerdings enthält Serumalbumin auch eine freie SH-Gruppe, die redox-aktiv und in der Lage ist, mit freien Thiol-Gruppen der redox-sensitiven NP zu reagieren oder aber deren Disulfid-Brücken zu reduzieren. [42] [84] [85] [86] [87] Aber eine Interaktion kann auch Vorteile mit sich bringen. So können die NP beispielsweise durch eine sie umgebende Proteinschicht vor den körpereigenen Abwehrmechanismen geschützt werden.

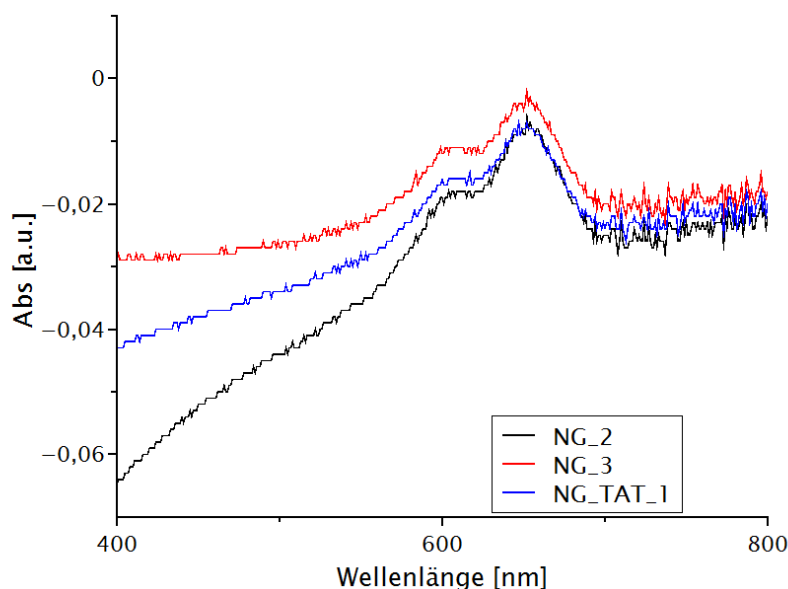
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob Blutplasmae Proteine mit den redox-sensitiven NP in wechselseitiger Beziehung stehen und ob gegebenenfalls bestehende Wechselwirkungen einen Einfluss auf den vorzeitigen Abbau und die Aufnahme in die Zellen haben. Für alle Untersuchungen zur Interaktion von NP mit Proteinen diente Bovines Serumalbumin (BSA) beispielhaft als Protein, da Serumalbumin in jedem lebenden Säuger-Organismus in großen Mengen vorkommt.

#### **5.4.1 Protein-Adsorption an redox-sensitive Nanopartikel**

Zunächst war es wichtig, einen ersten Anhaltspunkt bezüglich einer möglichen Protein-Adsorption an redox-sensitive NP zu gewinnen. Für diese erste Untersuchung wurde mit Hilfe von 0,01 molarem Puffer und mit Cy5-NHS-Ester funktionalisiertem BSA eine BSA-Lösung hergestellt und zu drei unterschiedlichen, nicht markierten NP-Lösungen hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und die Absorbanz des Überstandes mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Anhand des gemessenen Wertes am Anregungsmaximum (646 nm) und einer zuvor mit einer BSA-Cy5-NHS-Ester-Lösung erstellten Kalibriergerade sollte dann die Proteinkonzentration im Überstand kalkuliert werden. Basierend auf der im Überstand vorhandenen Proteinkonzentration und der zu Beginn des

Experimente eingesetzten Menge an BSA wurde abschließend die Menge des an die redox-sensitiven NP adsorbierten BSA berechnet.

Nach 15-minütigem Zentrifugieren (Rotor 12 154-H, 14 000 U/min) ist am Boden des Eppendorf-Safe-Lock-Gefäßes bei allen 3 Proben deutlich ein blauer Rückstand zu erkennen. Dieser Rückstand entspricht einem Pellet aus NP, an die mit Cy5 markiertes BSA in irgendeiner Form gebunden ist. Die Blaufärbung des Überstandes hingegen hat deutlich an Intensität verloren. Diese Beobachtungen sind ein erster Hinweis auf eine stattfindende Protein-Adsorption oder -Absorption. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Rückstand nicht ausschließlich um markiertes BSA handelt, das sich beim Zentrifugieren abgesetzt hat, wurde zur Kontrolle reine BSA-Cy5-NHS-Ester-Lösung für 15 Minuten bei 14000 rpm (Rotor 12 154-H) zentrifugiert. In diesem Fall kann keine Pellet-Bildung beobachtet werden. Auch eine Änderung der Blaufärbung der BSA-Cy5-NHS-Ester-Lösung ist nicht erkennbar.

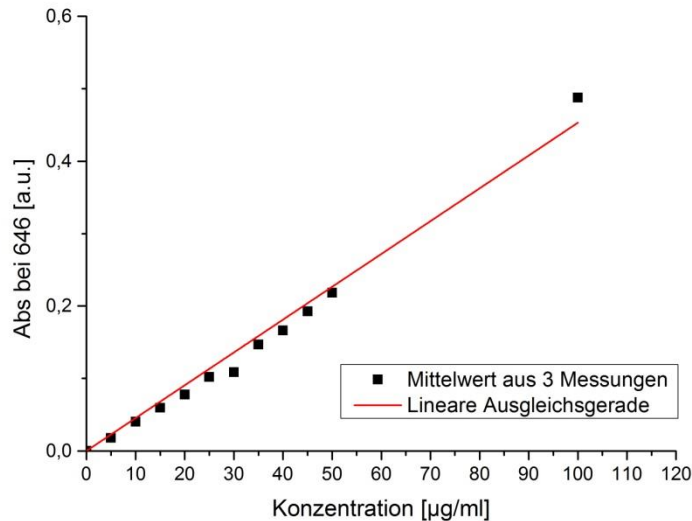


**Abbildung 28:** UV/Vis-Spektroskopie der NG-Überstände nach Zentrifugieren (15 Minuten, 14000 rpm). Alle Proben wurden gegen reine NP-Lösung gemessen.

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie der Proben-Überstände nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 14000 rpm graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die höchsten Extinktionswerte für alle 3 Proben im Bereich des Anregungsmaximums von Cy5 bei 646 nm liegen. Bei genauerem Betrachten der Messergebnisse ergibt sich allerdings folgendes Problem: wenn die Referenzprobe in Ordnung ist, dürften eigentlich keine negativen Extinktionen gemessen werden. Demnach muss die Referenzprobe, die zur Kalibrierung des UV/Vis-Photospektrometers gedient hat, infolge von ihrer Polydispersität stärker absorbiert haben als die 3 Proben der NG-Überstände. Wahrscheinlich ist, dass in den 3 Proben der NG-Überstände nach 15-minütigem Zentrifugieren kaum noch NP vorhanden sind, da sich diese vermutlich am Boden des Eppendorf-Safe-Lock-Gefäßes im Pellet mit absetzen. Im Gegensatz dazu enthält die als Referenzlösung verwendete, reine NP-Lösung eine Vielzahl an unterschiedlich großen NP, die alle das eingestrahlte Licht absorbieren, was letztendlich bei der Messung in negativen Extinktionswerten resultiert. Zur Verifizierung der Messergebnisse sollte das Experiment wiederholt und als Referenz eine reine NP-Lösung verwendet werden, die zuvor 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert wurde.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration im Überstand anhand einer UV/Vis-Spektroskopie ist möglich, da die Extinktion bei einer spezifischen Wellenlänge proportional zur Konzentration des an BSA gebundenen Fluorophors Cy5 ist (siehe Lambert-Beer'sches Gesetz, Formel 4). Zuvor muss aber eine Kalibriergerade mit Hilfe von BSA-Cy5-NHS-Ester-Lösungen bekannter Konzentrationen erstellt werden. Das Vorgehen wurde bereits in Kapitel 4.3.5.2 ausführlich beschrieben. Abbildung 29 zeigt die Kalibriergerade für mit Cy5-NHS-Ester funktionalisiertes BSA. Die Ergebnisse aller 3 für die Erstellung der Kalibriergeraden herangezogenen Messungen wiesen lediglich Abweichungen im Bereich von 0 a.u. bis  $5,8 \cdot 10^{-4}$  a.u. auf, so dass die Fehlerbalken im Folgenden nicht dargestellt werden können.





**Abbildung 29:** Kalibriergerade (Geradengleichung:  $y = 0,00453 x$ ) zur Bestimmung der im Proben-Überstand vorhandenen BSA-Konzentration – basierend auf der Extinktion des an BSA gebundenen Fluorophors Cy5-NHS-Ester am Anregungsmaximum. Als Baseline für die Messungen zur Erstellung der Kalibriergerade diente 0,01 molarer PBS-Puffer.

Bei der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie muss allerdings beachtet werden, dass diese Ungenauigkeiten aufweisen kann. Dies ist hauptsächlich auf die Tatsache zurück zu führen, dass die Fluoreszenzintensität des Fluorophors mit jeder Lichtexposition ein wenig schwächer wird. Somit besteht die Gefahr, dass ein bestimmter Anteil des Fluorophors der Detektion durch die UV/Vis-Spektroskopie entgeht.

Aufgrund der Tatsache, dass negative Extinktionen gemessen wurden, ist eine ungefähre Berechnung der im Überstand verbliebenden und der an die NP adsorbierten Proteinmenge nur möglich, wenn die Extinktionsspektren entlang der y-Achse nach oben verschoben werden. Tabelle 31 fasst die Ergebnisse der Berechnungen basierend auf einem Extinktionswert von 0,015 bzw. 0,020 zusammen.

**Tabelle 31:** BSA-Adsorption an redox-sensitive NP

Nanogel	Partikel- konzentration [Partikel/ml]	Kalkulierte Extinktion [a.u.]	Nicht adsorbiertes Protein [ $\mu\text{g}$ ]	Adsorbiertes Protein [%]
NG_2	$2,5 \cdot 10^{10}$	0,015	3,3	67
NG_3	$4,0 \cdot 10^{11}$	0,020	4,4	56
NG_TAT_1	$4,3 \cdot 10^{11}$	0,015	3,3	67

Bei allen drei Proben ist Protein infolge von Adsorption an die NG-Partikel oder Absorption aus der Lösung abgeschieden worden. Das bedeutet, unter diesen Bedingungen, bei BSA-Konzentrationen von ca.  $8,3 \mu\text{g/ml}$  ( $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ g/ml}$ ) Gesamtlösung, mit einem Verhältnis NG-Partikel zu BSA-Cy5 von  $10 \mu\text{g}$  BSA pro  $1000 \mu\text{l}$  NG-Lösung bzw. ca.  $3 \times 10^9$  bis  $5 \times 10^{10}$  Partikeln pro  $\mu\text{g}$  BSA findet im Fall von NG\_2 und NG\_TAT\_1 zu gut zwei Drittel, im Fall von NG\_3 zu etwas mehr als der Hälfte eine Ausfällung des Proteins statt. Für alle drei Proben ist eine Protein-Adsorption/-Absorption nachweisbar. Dafür spricht auch, dass der NG-Überstand im Vergleich mit der Ausgangsprobe deutlich an Blaufärbung verliert, das entstandene Pellet aber eine deutliche Blaufärbung aufweist.

### 5.5 Live-Cell-Mikroskopie

Neben den Wechselwirkungen zwischen NP und Blutbestandteilen ist auch die Aufnahme von NP in die Zelle von großem Interesse. Für die adäquate Funktion der NP als Wirkstoff-Transportsysteme ist es äußerst wichtig, dass die NP im Organismus nicht nur zu den Zielzellen gelangen, sondern von diesen auch aufgenommen werden, damit der Wirkstoff letztendlich dann gezielt im Zellinneren freigesetzt werden kann. In den letzten Jahren sind bereits einige Studien veröffentlicht worden, die eine Aufnahme von NP in unterschiedliche Zellen belegen. <sup>[88] [89]</sup>

Bei der Synthese der NP kann man sich, um eine Zellaufnahme der NP zu gewährleisten, diverser Fusionsproteine bedienen. Zu diesen zählt auch das Tat-Protein, eine Proteinsequenz des Humanen Immundefizienz-Virus, die nahezu von allen Zellen in Zellkultur aufgenommen wird. So wird eine Einschleusung von unter anderem DNA, RNA, Peptiden, aber auch von NP in die Zielzellen durch eine Anbindung an das Tat-Protein ermöglicht. <sup>[67]</sup> <sup>[68]</sup> <sup>[69]</sup> Allerdings ist über den exakten Aufnahmemechanismus unter Verwendung des Aufnahmeproteins Tat in Kombination mit NG noch wenig bekannt. Daher erscheint es sinnvoll, dem Zellaufnahmemechanismus der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten redox-sensitiven NP genauer auf den Grund zu gehen.

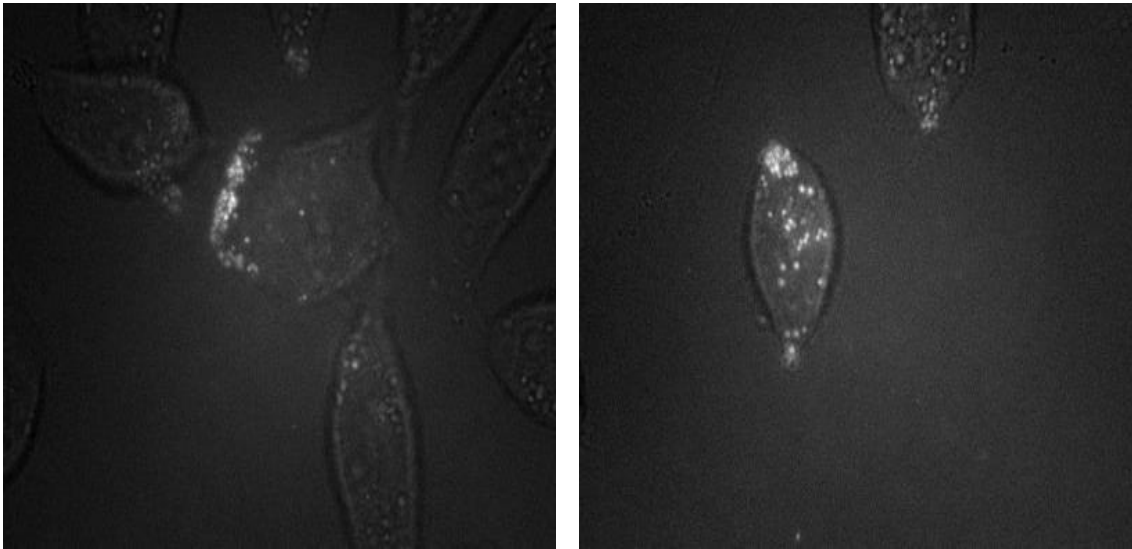
Die *Live-Cell*-Mikroskopie dient der Untersuchung dieser Aufnahme-Prozesse. Der Weg der durch die Bestrahlung mit einem Laser zum Fluoreszieren angeregten Fluorophor-funktionalisierten NP in und durch die Zelle kann mit Hilfe der *Live-Cell*-Mikroskopie untersucht werden. Auch ist es möglich Moment- und Videoaufnahmen anzufertigen, die es erlauben, den Zellaufnahmeprozess über einen längeren Zeitraum zu beobachten, ohne dass ein aufwendiges Fixieren der Zellen nach unterschiedlichen Zeitintervallen nötig wird.

In der vorliegenden Arbeit galt bei den Untersuchungen zum Zellaufnahmemechanismus das Hauptinteresse den redox-sensitiven NP. Verglichen wurde die Zellaufnahme von mit dem Tat-Protein funktionalisierten NP und von NP ohne Fusionsprotein.

#### **5.5.1 Tat- und AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel**

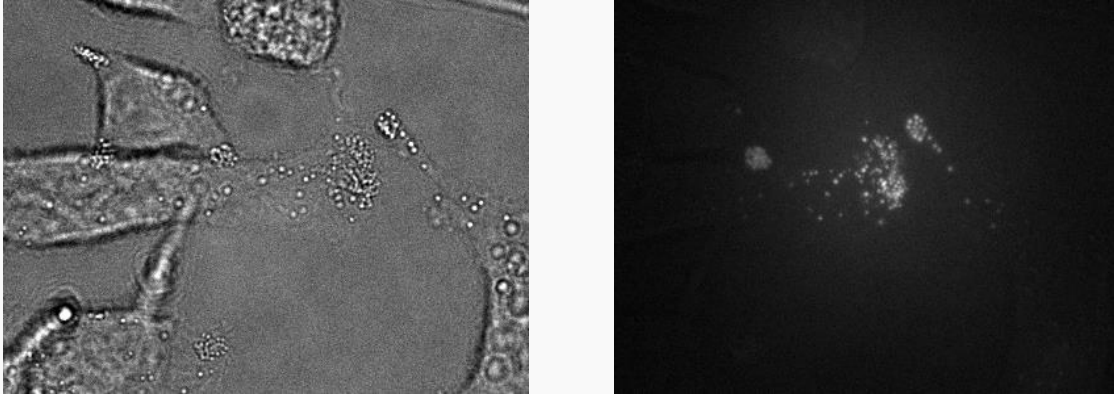
Die Abbildungen 30-32 zeigen bei der *Live-Cell*-Mikroskopie mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops und einer Kamera angefertigte Momentaufnahmen der HeLa-Zellen nach unterschiedlich langer Inkubation mit Tat-funktionalisierten, redox-sensitiven NP. Die deutlich erkennbaren hellen Punkte in den Aufnahmen entsprechen den fluoreszierenden NP. Der größte Anteil der Fluoreszenz konzentriert sich augenscheinlich auf kleine Vesikel, die in der ersten Aufnahme

nach einstündiger Inkubation hauptsächlich am Rand der Zellen lokalisiert sind. Nach zweistündiger Inkubation befindet sich ein Großteil der die fluoreszierenden NP enthaltenden Bläschen noch immer an bestimmten Ecken der Zelle. Es hat allerdings scheinbar auch eine Wanderung der Vesikel in Richtung Zellinneres eingesetzt.



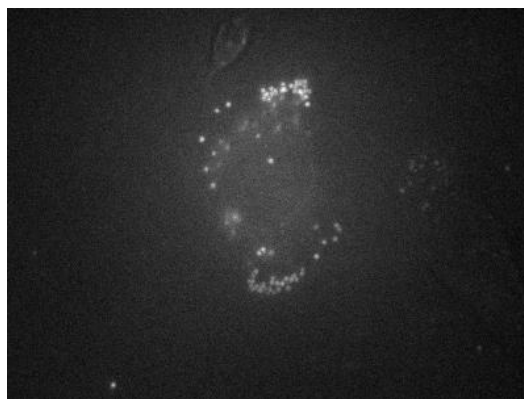
**Abbildung 30: Links:** HeLa-Zellen nach 1 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), fluoreszierende NP in Vesikeln am Rand der Zelle lokalisiert; **Rechts:** HeLa-Zellen nach 2 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), fluoreszierende NP in Vesikeln an bestimmten Ecken der Zelle lokalisiert, langsame Wanderung der fluoreszierenden Vesikel Richtung Zellinneres hat eingesetzt

Den Momentaufnahmen nach vierstündiger Inkubation ist zu entnehmen, dass sich der Wanderungstrend der fluoreszierenden Vesikel in Richtung Zellinneres fortsetzt. Zwar findet sich eine Vielzahl der Vesikel noch immer am Rand der Zellen, dennoch sind deutlich vermehrt NP enthaltende Vesikel im Cytoplasma auszumachen.



**Abbildung 31:** HeLa-Zellen nach 4 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), Wanderung der fluoreszierenden Vesikel in Richtung Zellinneres

Abbildung 32 zeigt eine Momentaufnahme nach achtstündiger Inkubation mit Tat- und AF680-funktionalisierten, redox-sensitiven NP. Im Vergleich zu den Aufnahmen nach zweistündiger Inkubation ist die Fluoreszenz und somit auch die Konzentration an NP im Cytoplasma höher, wobei ein Vordringen in den Zellkern nicht beobachtet werden kann. Der Bereich des Zellkerns bleibt dunkel. Die Partikel befinden sich auch nach 8 Stunden noch in den Vesikeln, was gegen eine Freisetzung der Partikel aus den Vesikeln und den Zerfall der NP zur Freisetzung des Wirkstoffes spricht.

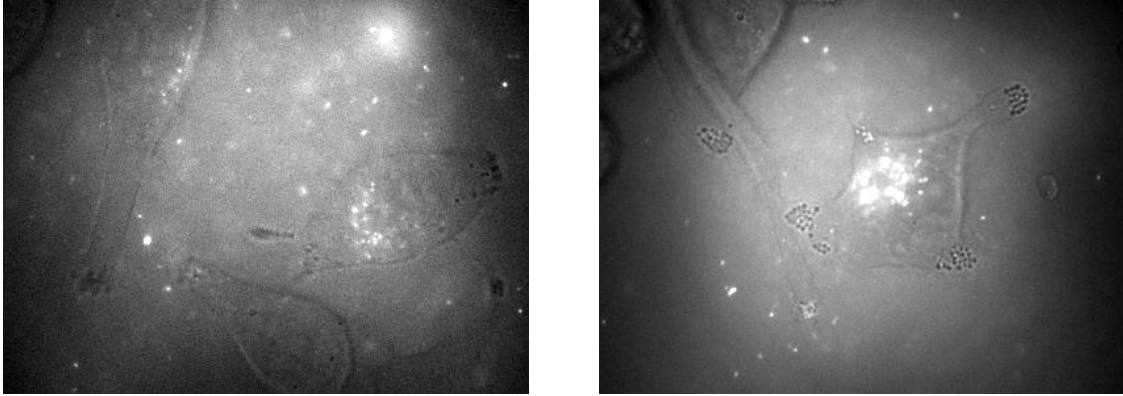


**Abbildung 32:** HeLa-Zellen nach 8 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2); fluoreszierende, NP enthaltende Vesikel im Zellinneren lokalisiert, scheinbar keine Aufnahme der Vesikel in den Zellkern; keine Öffnung und Entleerung der Vesikel erkennbar

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mit Tat funktionalisierten redox-sensitiven NP von den Zellen aufgenommen werden. Es ist davon auszugehen, dass NP via Endozytose in die HeLa-Zellen transportiert werden. Ein Indiz für diese Vermutung ist die deutlich erkennbare Vesikelbildung, die in manchen Bereichen der Plasmamembran verstärkt beobachtet werden kann. Für die Aufnahme der Partikel durch Endozytose spricht auch das Ablösen der Vesikel von der Zellmembran und die Wanderungstendenz der die NP enthaltenden Vesikel in Richtung Zellinneres. Der genaue Vorgang der Vesikelbildung und –ablösung konnte aber noch nicht aufgezeichnet werden.

### **5.5.2 AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel ohne Fusionsprotein**

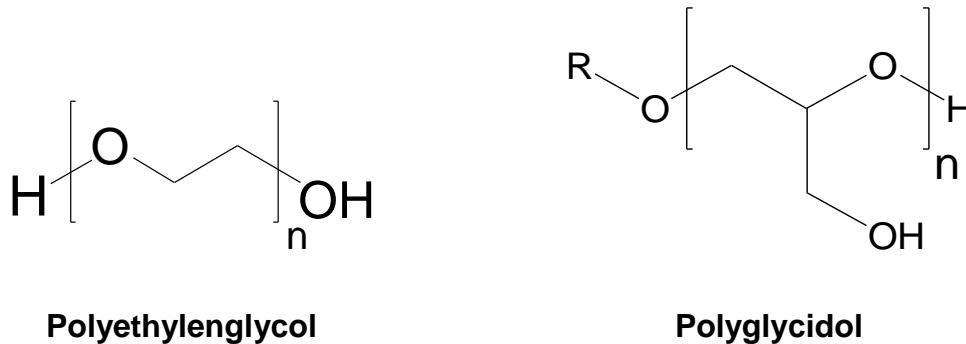
In Abbildung 33 sind zwei während der *Live-Cell*-Mikroskopie angefertigte Momentaufnahmen der HeLa-Zellen nach eindreiviertelstündiger und nach vierstündiger Inkubation mit redox-sensitiven NP, die kein Fusionsprotein enthalten, dargestellt. Die Qualität der Aufnahmen wird durch ein relativ starkes Hintergrundrauschen aufgrund von einer Aggregatbildung der NP beeinträchtigt, was in einer teilweisen Überlagerung der Fluoreszenz der einzelnen NP resultiert. Dennoch können einzelne fluoreszierende Punkte in Lösung ausgemacht werden, die den einzelnen NP entsprechen. Ein hoher Weißabgleich lässt bei diesen Aufnahmen den Eindruck einer scheinbar hohen Fluoreszenzintensität entstehen. NP enthaltende Vesikel, wie sie bei den Tat-funktionalisierten Proben vorkommen, können nicht beobachtet werden. Im Bereich der Plasmamembran können lediglich nicht fluoreszierende Vesikel erkannt werden. Eine Zellaufnahme kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Möglicherweise kommt es zu einer stark reduzierten Aufnahme der NP verglichen mit jener der mit Tat funktionalisierten NP.



**Abbildung 33: Links:** HeLa-Zellen nach 1,45 h Inkubation mit NP (NG680\_4), starkes Hintergrundleuchten durch Aggregatbildung, fluoreszierende NP frei in Lösung; fluoreszierende, mit NP beladene Vesikel im Zellinneren nicht klar erkennbar; **Rechts:** HeLa-Zellen nach 4 h Inkubation mit NP (NG680\_4), fluoreszierende NP frei in Lösung; fluoreszierende Endozytose-Vesikel innerhalb der Zelle nicht klar erkennbar

## 6 Diskussion

### 6.1 Vorteile des Einsatzes von Polyglycidolen vs. Polyethylenglycol zur Herstellung von funktionalisierten NP



**Abbildung 34:** Vereinfachte Strukturformeln von Polyethylenglycol (PEG) und Polyglycidol (PG)

Bei Polyethylenglycol (PEG) handelt es sich um ein Polymer mit einer bzw. zwei endständigen Hydroxylgruppe(n). Dadurch ist PEG sehr gut wasserlöslich. Desweiteren besitzen Polyethylenglycole niedrige Toxizitätswerte und sind mit den unterschiedlichsten Molekulargewichten und Qualitäten kommerziell verfügbar. Aufgrund dieser Eigenschaften kommt PEG bereits seit vielen Jahren in der Medizin und Pharmazie, beispielsweise als Wirkstoffträger, aber auch in der zellbiologischen Forschung zum Einsatz. Durch Anbindung eines PEG-Moleküls an eine hydrophobe Verbindung oder ein hydrophobes Molekül wird diese(s) wasserlöslich. Dieses Charakteristikum macht man sich unter anderem beim Transport von sonst wasserunlöslichen Wirkstoffen durch biologische Systeme zu Nutze. <sup>[12] [90] [91]</sup>

Auch Polyglycidol (PG) besitzt diese oben genannten positiven Eigenschaften, ist hydrophil und biokompatibel. Im Gegensatz zu PEG, das an den Ketten-Enden lediglich je eine funktionelle OH-Gruppe aufweist, hat PG an jeder Wiederholungseinheit eine funktionelle Hydroxylgruppe, die modifiziert werden kann (siehe Abbildung 34). Dadurch wird das Einbringen zahlreicher



Funktionalitäten ermöglicht. So können unter anderem pharmazeutische Wirkstoffe, Farbstoffe und andere Hilfsmoleküle an das PG-Molekül gekoppelt werden, was wiederum eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten eröffnet. [3] [92]

In der vorliegenden Arbeit kam Thiol-funktionalisiertes PG (PG-SH) zur Anwendung. Dafür wurden einige OH-Gruppen des PG mit Thiol funktionalisiert, was wiederum die Anbindung von anderen Molekülen über eine Disulfidbrücke erlaubt.

Bei der NP-Synthese kamen zwei unterschiedliche Ausgangspolymere zum Einsatz. Während zunächst noch das esterhaltige PG-SH (PG<sub>EH</sub>-SH) für die Herstellung der NG verwendet wurde, erfolgte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit ein Wechsel zu esterfreiem PG-SH (PG<sub>EF</sub>-SH). PG<sub>EF</sub>-SH ist, verglichen mit PG<sub>EH</sub>-SH, weniger anfällig gegenüber Hydrolyse, was sich positiv auf die Stabilität des Polymers auswirkt.

## 6.2 Funktionalisierung von Polyglycidol-Thiomerer

Damit die aus den Thiol-funktionalisierten PG gebildeten NP in dem für die Zellaufnahme-Untersuchungen eingesetzten Verfahren der Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden können und das „Live Cell Imaging“ der NG ermöglicht wird, musste eine Fluoreszenzmarkierung mit dem entsprechenden Farbstoff zur Visualisierung eingeführt werden. Hierfür wurden die Pre-Polymere vor der NG-Synthese mit einem Fluorophor funktionalisiert. Für die Funktionalisierung wurde eine kovalente Anbindung an die Thiol-Gruppen des Polymers, welche auch zur Vernetzung der NG dienen, gewählt. Es galt die geeignete Anbindungsmethode des Fluoreszenzfarbstoffes an die PG-Thiomere zu finden, die eine ausreichende Funktionalisierung ermöglicht. Es war darauf zu achten, dass bei der späteren NG-Synthese, bei der mehrere PG über Disulfidbrücken quervernetzt werden, eine möglichst stabile Fluoreszenz der

einzelnen NP erreicht wird, ohne dass es durch einen zu hohen Funktionalisierungsgrad zu Fluoreszenzlöschung kommt.

Es wurde zum einen die Michael-Addition gewählt, da diese bevorzugt bei der Funktionalisierung von Cystein-haltigen Proteinen angewandt wird und die entsprechenden Maleimid-funktionalen Farbstoffe biokompatibel und einfach zu erwerben sind. Entsprechend der Literatur liefert diese Methode gute Ausbeuten in wässrigem Medium.<sup>[93] [94] [95]</sup> Bei der Funktionalisierung mit Hilfe der Michael-Addition wurde in erster Linie die Menge des eingesetzten Farbstoffes variiert, um einen ausreichend hohen Markierungsgrad zu erreichen. Da dies jedoch nicht zu dem erwünschten Funktionalisierungsgrad, der für die spätere Anwendung nötig ist, führte, wurde alternativ die Anbindung eines mit Alkin funktionalisierten Fluorophors an die Thiol-Gruppen des Polymers mit Hilfe der UV-Click-Reaktion durchgeführt. Vorteilhaft ist hier die quantitative und schnelle Umsetzung der Edukte.<sup>[96]</sup> Ein Nachteil ist die Verwendung von UV-Licht, das zu einer teilweisen Zerstörung des Fluoreszenzfarbstoffes und infolgedessen zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität der NP führen kann. Die Reduzierung der Fluoreszenz für das verwendete Cy5-Alkin wurde in einem Vorversuch ermittelt und liegt bei etwa 20 % nach 2 Minuten.

Es wurden Funktionalisierungsreaktionen mit den folgenden Fluorophoren durchgeführt: Alexa Fluor 680-Maleimid, Cy7-Maleimid sowie Cy5-Alkin.

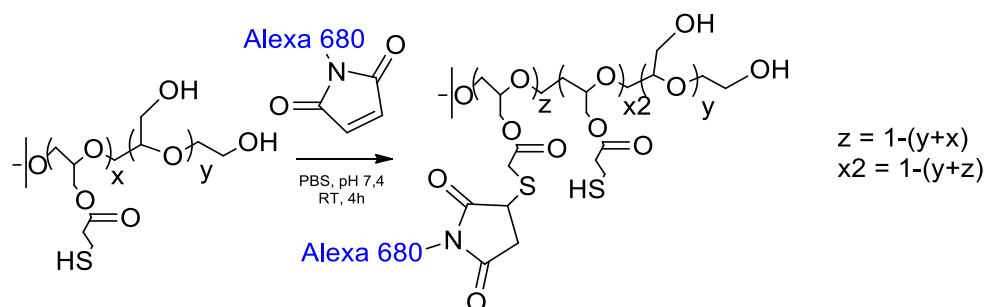
Tabelle 32 gibt einen Überblick über die bei der Funktionalisierung der PG zur Anwendung gekommenen Anbindungsmethoden und die dafür verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Während die Anbindung des Fluorophors bei den Ansätzen PG-SH-AF680-1, PG-SH-AF680-2, PG-SH-Cy7-1 und PG-SH-Cy7-2 über eine Michael-Addition erfolgte, wurde im Fall von PG-SH-Cy5-1 die UV-Click-Reaktion gewählt.

Im Folgenden werden die Funktionalisierungsansätze im Einzelnen diskutiert.

**Tabelle 32:** Übersicht der mit einem Fluorophor funktionalisierten PG

Ansatz	Fluorophor	Anbindungs- methode	Theoretischer Funktionali- sierungsgrad	Tatsächlicher Funktionali- sierungsgrad
<b>PG<sub>EH</sub>-SH-AF680-1</b> (esterhaltig)	1 mg Alexa Fluor 680- Maleimid	Michael- Addition	jede 41. Polymerkette	Wurde nicht bestimmt
<b>PG<sub>EH</sub>-SH-AF680-2</b> (esterhaltig)	1 mg Alexa Fluor 680- Maleimid	Michael- Addition	jede 41. Polymerkette	Wurde nicht bestimmt
<b>PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1</b> (esterfrei)	5 mg Cy7- Maleimid	Michael- Addition	jede 4. Polymerkette	jede 13. Polymerkette
<b>PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2</b> (esterfrei)	10 mg Cy7- Maleimid	Michael- Addition	jede 2. Polymerkette	jede 16. Polymerkette
<b>PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1</b> (esterfrei)	5,57 mg Cy5- Alkin	Click-Chemie	jede 3. Polymerkette	jede 10. Polymerkette

### 6.2.1 Funktionalisierung mit Alexa Fluor 680-Maleimid

**Abbildung 35:** Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von PG<sub>EH</sub>-SH mit Alexa Fluor 680-Maleimid über die Michael-Addition

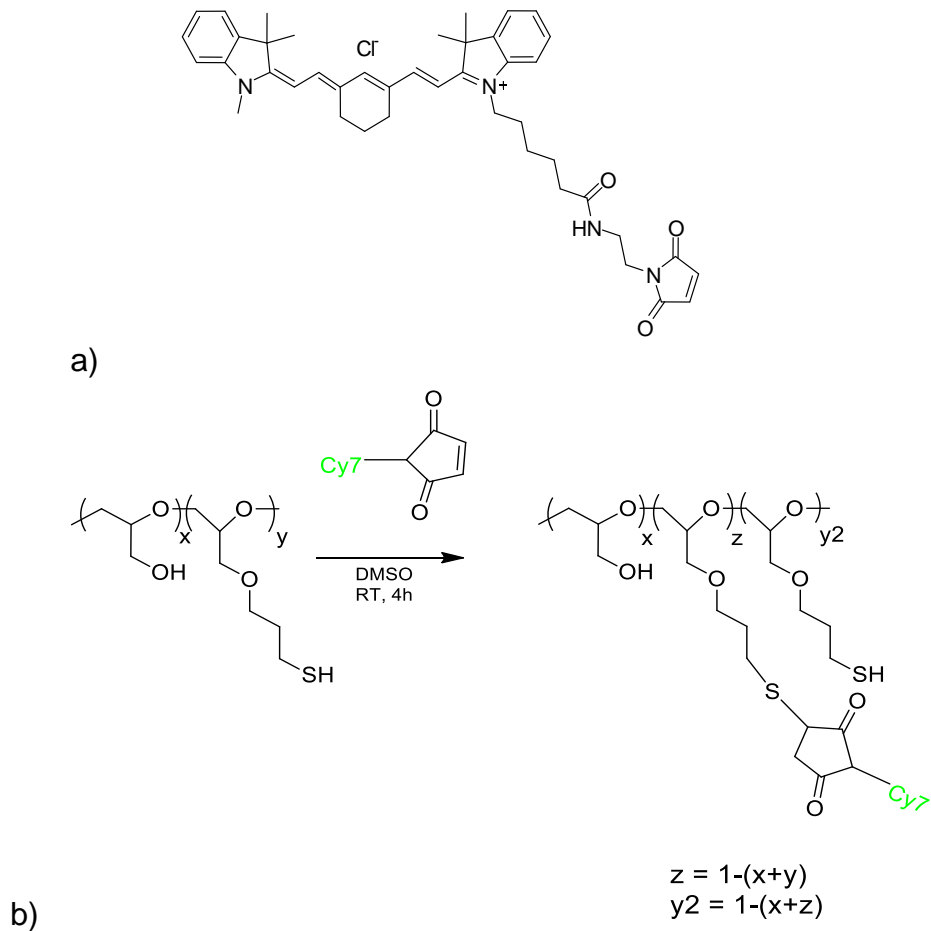
Die in Abbildung 35 dargestellte Reaktionsgleichung zeigt die Funktionalisierung von  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  mit Alexa Fluor 680-Maleimid. Die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt über eine kovalente Bindung zwischen Alexa Fluor-Maleimid und einer Thiol-Gruppe des PG.

Für die Funktionalisierung von  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  wurde sowohl im Ansatz  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  als auch im Ansatz  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$  1 mg (0,87  $\mu\text{mol}$ ) des Fluorophors Alexa Fluor 680 eingesetzt. Bei 100%igem Reaktionsumsatz würde lediglich jede 41. Polymerkette mit einem Fluorophor-Molekül markiert werden. Aufgrund der leichten Blaufärbung des Dialyse-Wassers bei der abschließenden Aufreinigung des Reaktionsproduktes muss davon ausgegangen werden, dass Farbstoff in freier und wahrscheinlich auch in an  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  gebundener Form bei der Dialyse verloren geht. Im Fall von  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-1}$  konnten nach der Gefriertrocknung 86 mg markiertes Polymer von 200 mg eingesetztem Polymer isoliert werden, was einem Verlust von 57 % entspricht. Da angenommen wurde, dass ein signifikanter Anteil des Polymers bei der Dialyse mit einer Membran mit MWCO 3500 verloren geht, wurde für die Dialyse des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$  die Dialyse-Membran mit einer kleineren Molekulargewichtsgrenze von 1000 Dalton verwendet.

Dies führte zu einem geringeren Verlust von Polymer bei der Aufarbeitung: Im Fall von  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$  gehen von den zu Beginn der Reaktion eingesetzten 200 mg  $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH}$  42 mg während der Aufreinigung verloren, was einem Verlust von 21 % entspricht. Die Tatsache, dass die Verlustrate beim zweiten Ansatz ( $\text{PG}_{\text{EH}}\text{-SH-AF680-2}$ ) verbessert werden konnte, bestätigt die Entscheidung für die Dialyse-Membran mit kleinerer Ausschlussgrenze. Es wurde auch bei den weiteren Versuchen eine Membran mit MWCO 1000 eingesetzt, um niedermolekulare störende Nebenkomponten sicher zu entfernen und gleichzeitig unnötig hohe Verluste an Polymer zu vermeiden.

Trotz des Einsatzes der Dialyse-Membran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 1000 g/mol erscheint die Ausbeute dennoch unbefriedigend.

## 6.2.2 Funktionalisierung mit Cy7-Maleimid



**Abbildung 36:** a) Strukturformel von Cy7-Maleimid, b) Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von PG<sub>EF</sub>-SH mit Cy7-Maleimid über die Michael-Addition

Abbildung 36 zeigt die Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von PG-SH mit Cy7-Maleimid. Auch in diesem Fall erfolgt die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes über eine Michael-Addition, bei der das Cy7-Maleimid eine kovalente Bindung mit einer Thiol-Gruppe des PG eingeht.

Um eine möglichst effektive Anbindung des Farbstoffes an das Polymer zu etablieren, wurden für die Funktionalisierung des Polymers mit Cy7-Maleimid zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. In beiden Ansätzen kam PG<sub>EF</sub>-SH zum Einsatz. Die beiden Ansätze unterschieden sich lediglich in der Menge des

verwendeten Farbstoffes und in der Art der Aufbereitung. Nachdem bei der Aufbereitung des mit AF680 funktionalisierten PG hohe Produktverluste zu verzeichnen waren, wurde eine andere Aufbereitungsmethode gewählt, um so gegebenenfalls den Produktverlust zu verringern. Im Fall des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 wurden 5 mg (7,07  $\mu$ mol) Cy7-Maleimid eingesetzt, was bei theoretischem 100%igem Reaktionsumsatz die Markierung jeder 4. Polymerkette zur Folge hat. Die Aufreinigung dieses Ansatzes erfolgte durch Ausfällung mit Hilfe von Dichlormethan und abschließende Gefriertrocknung. Für den Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 wurden 10 mg (14,1  $\mu$ mol) Cy7-Maleimid verwendet. Das entspricht der doppelten Menge Fluoreszenzfarbstoff im Vergleich zum Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 bei gleichbleibender Menge Polymer und unveränderten Reaktionsbedingungen. Bei theoretischem 100%igem Reaktionsumsatz wird somit jede 2. Polymerkette mit einem Fluorophor-Molekül markiert. Die abschließende Reinigung des funktionalisierten PG<sub>EF</sub>-SH erfolgte im Fall von Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 durch Dialyse (MWCO: 1000 g/mol) und anschließende Gefriertrocknung.

Bei der Aufreinigung des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 durch Ausfällung mit Dichlormethan zeigt sich eine gut erkennbare Grünfärbung des Überstandes, wodurch auf das Auswaschen von freiem Fluoreszenzfarbstoff sowie evtl. von markierten niedermolekularen Bestandteilen des Polymers zu schließen ist. Daraus kann geschlossen werden, dass auch für den Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 kein 100%iger Reaktionsumsatz erfolgt ist. Zudem ist ein Verlust des Polymers von 53,8 % zu verzeichnen. Mögliche Gründe für den Verlust könnte eine gewisse Löslichkeit von niedermolekularen Polymeranteilen, sei es mit Cy7-Maleimid funktionalisiert oder nicht funktionalisiert, sein. Aufgrund dieses Ergebnisses erscheint eine Aufreinigung des markierten PG-SH durch Ausfällung mit Dichlormethan nicht vorteilhaft.

Auch bei der Aufbereitung des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 durch Dialyse zeigt sich eine starke Grünfärbung des Dialysewassers. Dies lässt den Rückschluss zu, dass auch hier wieder Farbstoff verloren geht und somit kein 100%iger

Reaktionsumsatz erfolgt ist. Nach der Gefriertrocknung des dialysierten Polymers werden 110 mg funktionalisiertes Polymer von den zuvor eingesetzten 200 mg PG-SH isoliert, was einem Polymer-Verlust von 45 % entspricht. Das bedeutet, dass die Grünfärbung des Dialyse-Wassers sowohl auf das mit Cy7 funktionalisierte Polymer als auch auf freien Farbstoff zurückzuführen ist.

Inwiefern das unterschiedliche Ausgangspolymer (esterhaltig vs. esterfrei) einen Einfluss auf den deutlich unterschiedlichen Polymerverlust bei der Aufarbeitung hat, lässt sich aufgrund fehlender Wiederholungsversuche nicht eindeutig sagen. Im Vergleich bietet eine Reinigung durch Dialyse mit MWCO <1000 einen Vorteil bezüglich der Polymer-Verlustrate und scheint einer Fällung mit Dichlormethan vorzuziehen zu sein.

Vergleicht man den Polymer-Verlust von Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 mit dem von PG<sub>EH</sub>-SH-AF680-2, fällt dieser im ersten Fall mit 45 % deutlich größer aus als im zweiten Fall mit 21 %, obwohl im Fall von PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 ein Polymer mit einem um ca. 1100 Dalton höheren mittleren Molekulargewicht eingesetzt wurde (s.o.) und in beiden Fällen die gleiche Dialysemembran mit derselben Molekulargewichtsgrenze zur Anwendung kam. Dies ist möglicherweise auf die verwendeten Lösungsmittel zurückzuführen. Während beim Ansatz PG<sub>EH</sub>-SH-AF680-2 für das Lösen von PG<sub>EH</sub>-SH und Alexa Fluor 680-Maleimid PBS-Puffer verwendet wurde, wurden sowohl das Cy7-Maleimid als auch das im Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 verwendete Polymer in DMSO gelöst. In beiden Fällen wurde die Reaktionslösung nach abgeschlossener Reaktion und vor der Dialyse mit PBS-Puffer weiter verdünnt. Laut Herstellerangaben ist die Verwendung sowohl von Puffern als auch von verdünnten organischen Lösungsmitteln, zu denen auch DMSO zählt, ohne Beschädigung der Dialysemembran möglich.<sup>[97]</sup> Es ist jedoch möglich, dass der Gehalt an DMSO in der Reaktionslösung von Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 auch nach der Verdünnung noch zu hoch ist und die Dialysemembran angreifen und gegebenenfalls deren Porengröße vergrößern kann, so dass es zu einem höheren Polymer-Verlust kommt. Dieser mögliche Einfluss sollte bei

weiteren Versuchen durch eine stärkere Verdünnung des Ansatzes mit PBS-Puffer untersucht werden.

Um die Effizienz der Markierungsreaktion bei beiden Ansätzen beurteilen zu können, wurde die Cy7-Maleimid-Konzentration in dem markiertem PG<sub>EF</sub>-SH mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie und einer zuvor erstellten Kalibriergeraden von reinem Cy7-Farbstoff bestimmt. Tabelle 33 fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 33:** Cy7-Maleimid-Konzentration und –Stoffmenge in mit Cy7 funktionalisiertem PG-SH

Ansatz	Konzentration der PG-SH-Cy7-Lösungen [mg/ml]	Cy7-Maleimid-Konzentration [µg/ml]	Verhältnis Polymer: Cy7
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-1	0,6	5,04	12,5:1
PG <sub>EF</sub> -SH-Cy7-2	0,7	4,64	15,9:1

Es zeigt sich, dass die Kopplungsreaktion des Ansatzes PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 zu einem höheren Funktionalisierungsgrad geführt hat, obwohl eine geringere Menge an Fluorophor bei gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt worden ist. Der Einsatz einer höheren Menge an Fluoreszenzfarbstoff scheint demnach nicht zwangsläufig zu einer dichteren Markierung der PG zu führen. Der theoretische erwartete Markierungsgrad wurde in keinem Fall erreicht. Im Fall von PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-1 war angestrebt, jede 4. Polymerkette zu markieren. Erhalten wurde eine Markierung jeder 13. Polymerkette, entsprechend einer Markierungseffektivität von 54%. Die starke Einfärbung des Dialysewassers war ein Hinweis auf unvollständigen Umsatz bei den Reaktionen.

Bei PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-2 wurde versucht, den Markierungsgrad durch eine Erhöhung des eingesetzten Cy7-Maleimids zu steigern. Trotz des Einsatzes der doppelten Menge an Farbstoff, welche eine angestrebte Markierung jeder 2. Polymerkette



bedeuten würde, wurde lediglich eine Markierung jeder 16. Polymerkette, entsprechend einer Markierungseffektivität von 45%, erzielt.

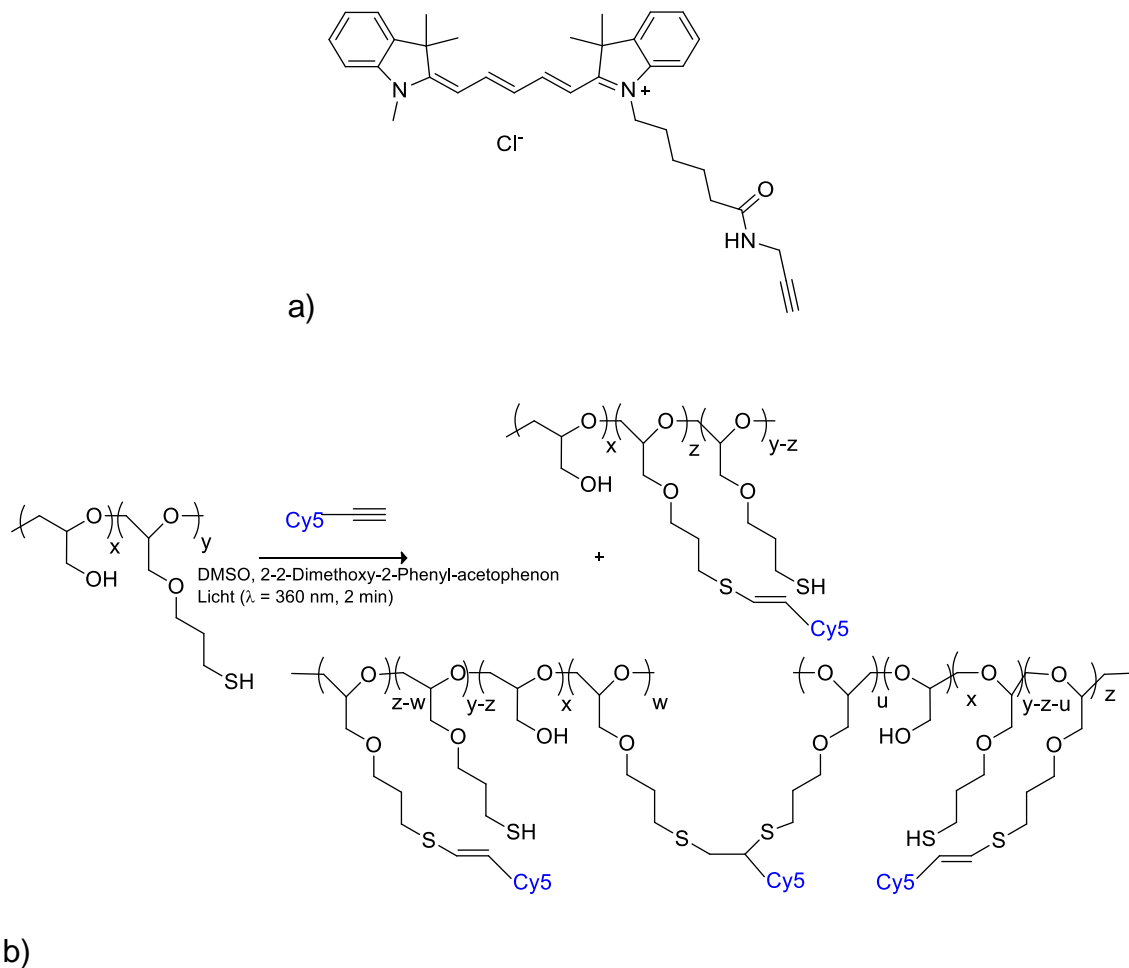
Diese Beobachtung scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zum Massenwirkungsgesetz zu stehen. Gründe für dies könnten sein:

- Es wäre möglich, dass keine ausreichend große Anzahl an reaktiven Sulfhydryl-Gruppen vorliegt. So könnten z.B. nicht-reaktive Disulfidbrücken vorliegen, da das eingesetzte PG-SH vor der Reaktion nicht reduziert wurde.
- Zu geringer Überschuss an Cy7-Maleimid (Literaturprotokoll des Herstellers schlägt für Markierung von biologischem Material 20-fachen Überschuss vor).
- Die Maleimid-Gruppe ist in wässriger Umgebung empfindlich gegenüber Hydrolyse und kann dadurch schon zum Teil zu einer nicht aktiven Form abreagieren.
- Der Farbstoff beginnt bei Lichtexposition auszubleichen und verliert seine Fähigkeit zu fluoreszieren, was unter anderem auch in einem geringeren Extinktionswert resultiert.
- Bei höheren Konzentrationen wäre es möglich, dass die langkettigen, hydrophoben Cy7-Maleimid-Moleküle miteinander wechselwirken, aggregieren und so bei der Umsetzung nicht ausreichend reaktiv sind. Dies ließe sich evtl. umgehen, indem man die Zugabe an Cy7-Maleimid in mehrere Portionen aufteilt.

Unter diesen Gesichtspunkten sollten für eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bei weiteren Ansätzen die folgenden Parameter weiter untersucht werden: Reduzierung der Ausgangskomponente mit z.B. TCEP, Variation des pH-Werts des Mediums, Einsatz von Lösungsmittel-/Puffer-Gemischen, Variation der Temperatur (selektivere Umsetzung bei tieferen Temperaturen, z.B. 0°C), Verwendung eines anderen organischen

Lösungsmittels, Variation der Stöchiometrie, Zugabe des Reagenzes in mehreren Portionen oder gelöst über eine längere Zeit und Reaktionsführung und Aufarbeitung unter Ausschluss von Licht.

### 6.2.3 Funktionalisierung mit Cy5-Alkin



In Abbildung 37 ist die Reaktionsgleichung für die Funktionalisierung von PG-SH mit Cy5-Alkin dargestellt. Hier erfolgt die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes an das PG mit Hilfe der lichtinduzierten Click-Chemie. Dabei wird bei Bestrahlung der Reaktionslösung mit einer Lichtquelle, die eine Wellenlänge von 360 nm besitzt, der vorliegende Fotoinitiator DMPA aktiviert. Es wird eine radikalische Spezies gebildet, die die Click-Reaktion des Alkins mit dem Thiol initiiert. Dadurch geht das Cy5-Alkin eine kovalente Bindung mit einer Thiol-Gruppe des PGs ein.

Eine Funktionalisierung mittels Click-Chemie wurde gewählt, nachdem bei der Funktionalisierung mit Maleimiden in mehreren Ansätzen nicht die gewünschte Effektivität des Labelings erreicht werden konnte. Trotz der Tatsache, dass bei der Funktionalisierung mittels lichtinduzierter Click-Chemie ein Teil des eingesetzten Fluorophors durch die Bestrahlung mit dem Laser zerstört werden kann, liefert diese Methode den Vorteil einer hohen Markierungs-Ausbeute, wie in der Literatur für ähnliche Reaktionen beschrieben worden ist. <sup>[96]</sup>

Im Ansatz PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 wurden 200 mg PG<sub>EF</sub>-SH und 5,57 mg (100,2 µmol) Cy5-Alkin für die Click-Reaktion eingesetzt. Bei 100%igem Reaktionsumsatz würde dies zu einer Markierung jeder 3. Polymerkette mit einem Fluorophor-Molekül führen. Auch hier wurde das Produkt durch Dialyse gereinigt (MWCO: 1000 g/mol) und anschließend gefriergetrocknet. Wie schon zuvor beschrieben kann eine deutliche Blaufärbung des Dialysewassers beobachtet werden. Somit muss auch bei diesem Ansatz davon ausgegangen werden, dass, trotz des großen Überschusses an freien SH-Gruppen, Farbstoff in freier und in an PG<sub>EF</sub>-SH gebundener Form bei der Dialyse verloren geht. So könnte evtl. die Reaktionszeit von 2 Minuten zu kurz für eine vollständige Umsetzung sein. Für weitere Umsetzungen sollte in diesem Zusammenhang zum einen die Reaktionszeit verlängert werden und zum anderen der Einfluss der Bestrahlungszeit auf die Stabilität der Reaktionskomponenten untersucht werden.

Nach Beendigung der Aufreinigung und Gefriertrocknung bleiben 51 mg markiertes Polymer von den zu Beginn der Reaktion eingesetzten 200 mg übrig.

Das kommt einer Verlustrate von 74,5 % gleich. Geht man davon aus, dass laut Literaturangaben die UV-Click-Reaktion praktisch quantitativ erfolgen sollte, würde dies dafür sprechen, dass die Blaufärbung des Dialysewassers vor allem durch mit Cy5 funktionalisiertem Polymer zustande kommt.

Bei der Aufbereitung des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  sind insgesamt 3,76 mg Cy5-Alkin (berechnet als freies Cy5-Alkin) in freier und gebundener Form aus dem Dialyseschlauch heraus diffundiert, was einem Fluorophor-Verlust von ca. 68 % entspräche. Der hohe Verlust an Fluorophor bei der Dialyse könnte einerseits auf eine unvollständige UV-Click-Reaktion (Verlust von ungebundenem, niedermolekularem Cy5-Alkin) hindeuten oder aber für eine Zersetzung der Polymerketten unter den Bedingungen der Reaktion (Bestrahlung mit energiereichem UV-Licht, Bildung von Radikalen aus DMPA) sprechen. In welcher Form, ob frei oder gebunden, das Fluorophor verloren ging, lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse allerdings nicht eindeutig klären.

Vergleicht man den Polymer-Verlust aller fünf in dieser Arbeit angesetzten Funktionalisierungs-Reaktionen, fällt dieser im Fall von Ansatz  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  am größten aus. Die Verluste an Polymer bei der Aufarbeitung lagen zwischen ca. 20 % und 70 %. Ursache könnten die relativ drastischen Reaktionsbedingungen sein (UV-Licht, Radikalreaktion). Vor dem Hintergrund der Literaturangaben zu diesem Reaktionstyp ist jedoch insgesamt der hohe Verlust von Polymer bei der Aufarbeitung des Ansatzes von  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  nur schwer zu erklären. Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen bei den Markierungsreaktionen über Michael-Additionen kann man davon ausgehen, dass bei der Dialyse (MWCO 1000) der  $\text{PG}_{\text{EH/EF}}\text{-SH}$ -Derivate mit einer angenommenen mittleren Ausgangs-Molekularmasse von ca. 5500 - 6600 offensichtlich ein Polymerverlust von ca. 21 – 45 % aus dem niedermolekularen Teil der Molmassenverteilungskurve auftritt. Nimmt man weiterhin an, dass auch bei  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  der Anteil an niedermolekularen Bestandteilen und damit der Verlust von Polymer bei der Dialyse in diesem Bereich liegt, spräche dieses Ergebnis eher dafür, dass es sich bei dem oben beschriebenen Fluorophor-

Verlust bei der Dialyse zu einem großen Teil (24 – 48 %) eher um nicht am Polymer gebundenes Cy5-Alkin handelt. Dies würde bedeuten, dass die Umsetzung nur unvollständig und die Reaktionsbedingungen somit suboptimal waren. So könnte evtl. die Reaktionszeit von 2 Minuten zu kurz für eine vollständige Umsetzung sein. Der im Vergleich zu den anderen Ansätzen erhebliche Verlust an Polymer bei der Aufarbeitung könnte allerdings, wie schon unter 6.2.2 beschrieben, auch hier mit der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel zu erklären sein. Eine weitere Ursache für die unbefriedigende Ausbeute bei der Herstellung von PGEF-SH-Cy5-1 könnte weiterhin daran liegen, dass sich die Ausgangsverbindungen durch die Bestrahlung mit der Lichtquelle (360 nm) teilweise zersetzen.

Für weitere Umsetzungen sollten in diesem Zusammenhang die Reaktionsbedingungen variiert werden (Reaktionszeit, Temperatur, Stöchiometrie, Lösungsmittel, Konzentration sowie die Menge des Photoinitiators). Des Weiteren sollte der Einfluss der Bestrahlungszeit auf die Stabilität der Reaktionskomponenten untersucht werden.

Eine andere Ursache könnte sein, dass sich ein Teil des Produkts an dem Photoinitiator DMPA welcher nach der Dialyse abzentrifugiert wird, adsorbiert und so über das DMPA-Pellet verloren geht. Bei Wiederholungsansätzen sollte zur Verbesserung der Ausbeute das Zentrifugationspellet resuspendiert und gewaschen bzw. eine andere Aufarbeitungsmethode, wie z.B. Gelchromatographie gewählt werden.

Die Effizienz der Funktionalisierung von PGEF-SH mit Cy5-Alkin und die Menge des an PG gebundenen Cy5 wurden auch für den Ansatz PGEF-SH-Cy5-1 mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Auffallend war allerdings, dass das gesamte Extinktionsspektrum von PGEF-SH-Cy5-1 in positiver Richtung entlang der y-Achse zu höheren Extinktionswerten verschoben war. Diese Befunde sprechen dafür, dass in der Probe noch signifikanten Mengen an Nebenkomponenten (DMPA oder dessen Zersetzungsprodukte) vorhanden sind. Die nach oben verschobene Baseline des Spektrums spricht dafür, dass die Lösung nicht

homogen ist, sondern ungelöste Komponenten vorliegen, die zu einer Abschwächung des bei der Messung verwendeten Lichtstrahls führen.

Auch wiederholte Messungen mit verschiedenen für die Kalibrierung des UV/Vis-Spektrometers verwendeten Proben als Baseline (BL), Lösungsmitteln und Farbstoff-Polymer-Kombinationen (Reinstwasser, DMSO, Wasser-DMSO-Gemisch, 5 mg PG<sub>EF</sub>-SH gelöst in Reinstwasser) führten zu keiner Veränderung. Da eine Konzentrationsbestimmung aufgrund der Verschiebung zu einer zu hohen Cy5-Alkin-Konzentrationen führen würde, erfolgte eine Korrektur des Extinktionsspektrums in Richtung der Baseline. Es ist jedoch zu beachten, dass dieser Anpassung eine weitere Fehlerquelle zusätzlich zu der Ungenauigkeit aufgrund von Fluoreszenzverlust bei Lichtexposition darstellt.

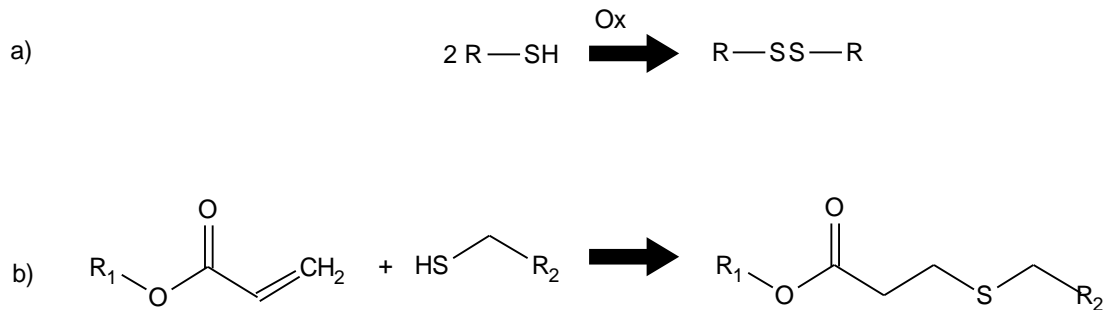
Für die Cy5-Konzentration wurde ein Wert von 2,17 µg/ml (3,90 nmol) ermittelt. Das entspricht 15,6 nmol Cy5-Alkin pro mg Polymer. Es erfolgte die Markierung ca. jeder 10. Polymerkette. Verglichen mit den zuvor beschriebenen Methoden erweist sich die Funktionalisierung über die UV-induzierte Click-Chemie somit als am effizientesten.

Diese Umsetzung ist noch optimierungsfähig bezüglich Verringerung des Polymerverlusts bei der Aufarbeitung (74,5 %) und Umsetzungsgrad des eingesetzten Cy5-Alkin (67,5 % nicht umgesetzt). Auch bezüglich der Reinheit des markierten Polymers (Beseitigung von Nebenkomponenten) besteht noch Optimierungspotential. Insgesamt erscheint PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-1 aufgrund des hohen erreichten Markierungsgrades als aussichtsreichster Kandidat für weitere Untersuchungen.

Wie oben diskutiert, werden noch Möglichkeiten gesehen, die Ausbeute der UV-Click-Reaktion zu steigern. Um die Problematik mit der verschobenen Grundlinie bei der spektroskopischen Charakterisierung der Verbindung zu vermeiden, sollte das Reaktionsprodukt bei weiteren Ansätzen filtriert werden, um störende Nebenkomponenten zu entfernen.

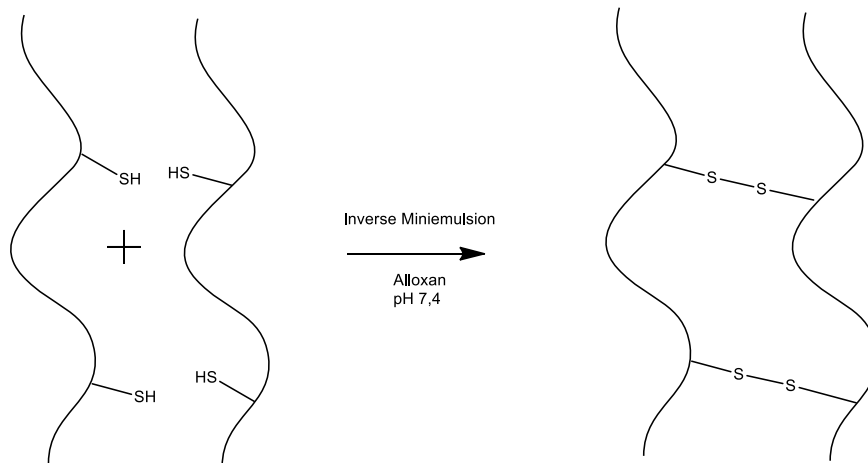
### 6.3 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Unter Punkt 3.2.2 wurden bereits die verschiedenen Herstellungsverfahren, die eine NP-Synthese ermöglichen, erläutert. Für die vorliegende Arbeit wurde das Verfahren in inverser Miniemulsion gewählt, da dieses die Synthese wasserlöslicher Partikel mit einer definierbaren Größe im Nanometerbereich erlaubt. Ziel war es sowohl redox-sensitive als auch nicht reduktiv degradierbare NP mit einer einheitlichen Größenverteilung < 500 nm herzustellen. Dabei wurde ein wasserlösliches, hydrophiles Präpolymer, das thiol-funktionalisierte PG, auf unterschiedliche Weise zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38:** a) NP-Synthese via Oxidation, b) NP-Synthese via Michael-Addition

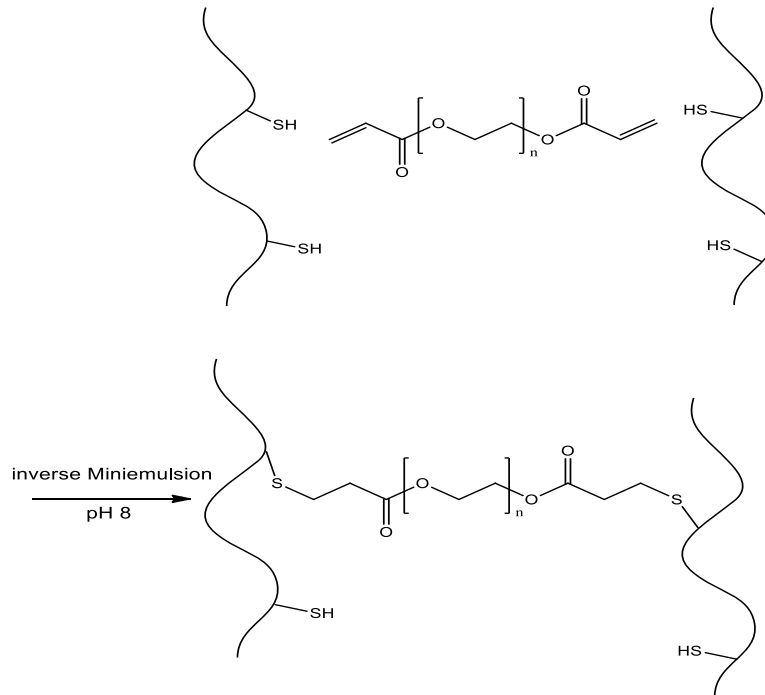
Die Verknüpfung der Präpolymere erfolgte im Fall der redox-sensitiven NP bei einem physiologischen pH-Wert via Oxidation der Thiol-Funktionen des PG zu Disulfidbrücken mit Hilfe des Oxidationsmittels Alloxan (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Reaktionsschema der Synthese redox-sensitiver „Standard“-NP; Oxidation der Thiol-Funktionen zu Disulfidbrücken unter Verwendung von Alloxan als Oxidationsmittel

Im Fall der nicht reduktiv degradierbaren NP existieren viele Ansätze, die ihre Herstellung möglich machen. Eine Möglichkeit ist die Synthese von NG über eine Michael-Addition. Da diese Reaktion bei einem für PBS-Puffer üblichen, physiologischen pH-Wert von 7,4 nur sehr langsam abläuft, muss ein biologisches Puffersystem mit höherem pH-Wert ( $\text{pH} = 8$ ) eingesetzt werden, weshalb als Grundlage für die wässrige Phase ein 0,04 M Phosphat-Puffer, bestehend aus Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) und Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), gewählt wurde. Als Crosslinker diente PEGDA, welches in der Lage ist mit den Thiol-Funktionen zweier PG zu reagieren und diese so zu verknüpfen (siehe Abbildung 40).





**Abbildung 40:** Reaktionsschema für die Synthese nicht reduktiv degradierbarer NP via Michael-Addition

Die Charakterisierung der NP ist besonders wichtig, weil sie eine routinemäßige Qualitätskontrolle der NG-Synthese und der Größenverteilung der dabei entstandenen Partikel erlaubt. Da die NP bei einem möglichen medizinischen Einsatz unter anderem intravenös appliziert werden sollen, darf ein mittlerer Partikeldurchmesser von 300 nm aufgrund der Gefahr einer potentiellen Embolie nicht überschritten werden.

Um die NP bezüglich ihrer Größe und Konzentration zu charakterisieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt: Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) und Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der Lichtstreuung.

Bei der NTA handelt es sich um eine relativ neue Methode, die sowohl Informationen über die Partikelgröße als auch Angaben über die Partikelkonzentration liefert. Die DLS hingegen gehört zu den etablierten

Charakterisierungsmethoden zur NP-Charakterisierung in Dispersion. Eine Konzentrationsbestimmung ist hier allerdings nicht möglich.

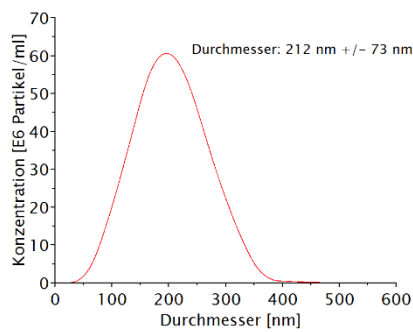
Neben einem Vergleich der beiden Verfahren ist auch der Einfluss der für die NP-Synthese verwendeten Ausgangspolymere auf die Partikelgröße von Interesse. Während es sich bei dem Präpolymer der zu Beginn dieser Arbeit synthetisierten NP (NG\_1-3, NG\_TAT\_1, NG680\_1-4, NG680\_TAT\_1-2 und NG680\_MA\_1) um ein esterhaltiges PG-Thiomer handelt, wurde für die zu einem späteren Zeitpunkt hergestellten NG (NGCy7\_1, NGSy7\_MA\_1, NGSy5\_1, NGSy5\_TAT\_1, NG\_MA\_1-2 und NG\_Click\_1-2) ein esterfreies PG-Thiomer verwendet.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Funktionalisierung mit unterschiedlichen Fluorophoren die Größenverteilung der NP beeinflusst.

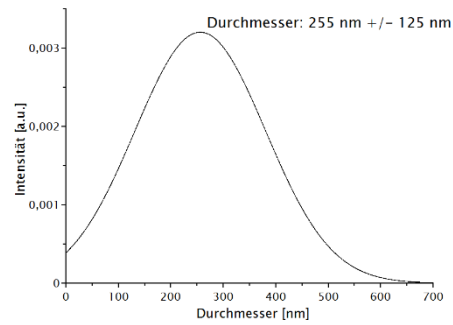
Während im ersten Abschnitt zunächst grundsätzlich die beiden Methoden zur Partikelcharakterisierung miteinander verglichen werden, beschäftigt sich der darauf folgende Abschnitt mit dem Einfluss der für die Funktionalisierung verwendeten Fluorophore auf die Partikelgröße und Größenverteilung.

### **6.3.1 Methodenvergleich von NTA und DLS**

In den Abbildungen 41-43 sind beispielhaft die Größenverteilungen der unterschiedlichen NG, welche jeweils mit Hilfe der NTA und der DLS ermittelt wurden, graphisch dargestellt. Abbildung 41 zeigt die Größenverteilung einer nicht fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersion. In Abbildung 42 ist die Größenverteilung einer mit AF680 markierten, redox-sensitiven NP-Dispersion dargestellt. Die Größenverteilungen in Abbildung 43 sind einer nicht markierten, nicht degradierbaren, über eine Michael-Addition hergestellten NP-Dispersion zuzuordnen.



a)



b)

**Abbildung 41:** Größenverteilung einer nicht fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersion (NG\_3): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS

Die Auswertung mittels NTA zeigt für NG\_3 eine relativ schmale, gut definierte, monomodale Größenverteilung mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 212 nm +/- 73 nm. Vergleicht man die Größenverteilungen, welche durch die beiden Methoden ermittelt wurden, fällt auf, dass die mittels DLS ermittelte Größenverteilung breiter ausfällt (durchschnittlicher Durchmesser 255 nm +/- 125 nm).

Grund für diese Diskrepanz ist in erster Linie in der für die beiden Messmethoden unterschiedlichen Vorbereitung der Proben zu suchen. Die DLS benötigt eine unverdünnte und ungefilterte, relativ hoch konzentrierte Probe, um eine ausreichende Signalintensität zu erhalten und damit aussagekräftige Messungen zu ermöglichen. In verdünnten Lösungen ist die Konzentration an NP meist zu gering und es kommt zu Problemen bei der Detektion der wenigen Partikel, so dass eine Partikelcharakterisierung nicht möglich ist. Allerdings birgt die Verwendung unverdünnter Proben auch gewisse Fehlerquellen. Ein Nachteil der unverdünnten Proben ist der starke Einfluss großer Partikel. Die Charakterisierung der NP erfolgt bei der DLS über das von den Partikeln gestreute Licht eines Lasers, welches detektiert wird. Befinden sich nun viele kleine und einige große Partikel in der zu messenden Probe, werden die Messungen zu den größeren Aggregaten hin verschoben, da das von den großen Partikeln ausgehende Streulicht stärker ist und das der kleineren Partikel

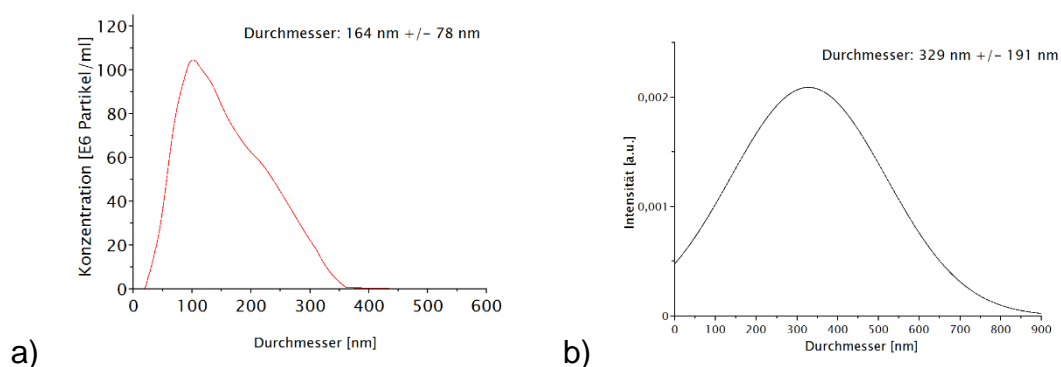
überlagert. Diese Tatsache ist durch die Rayleigh-Streuung bzw. -Näherung zu erklären, die besagt, dass der Durchmesser mit einer Potenz von 6 in die Intensität  $I$  der Streuung eingeht ( $I \sim d^6$ ). Das bedeutet, dass ein 50 nm großer Partikel eine Millionen ( $10^6$ ) mal mehr Licht streut als ein 5 nm großer Partikel. <sup>[30]</sup> Der durchschnittliche Partikeldurchmesser fällt somit größer aus, auch wenn hauptsächlich kleine und nur wenige große Partikel in der Probe vorkommen. Ein weiterer Nachteil ergibt sich bei der Messung polydisperser Proben, die Partikel mit unterschiedlicher Größe enthalten. Da auch hier in erster Linie das von den größeren Partikeln ausgehende Streulicht detektiert wird, repräsentiert die über mehrere Messungen ermittelte Größenverteilung nicht die reale Probe.

Im Gegensatz zu der Partikelcharakterisierung mit der DLS, bei der unverdünnte Proben zur Anwendung kommen, werden die Proben vor der Charakterisierung mit der NTA verdünnt und mit einem Nylon-Filter (Porengröße  $1,2 \mu\text{m}$ ) gefiltert. Dadurch werden größere Partikel und Aggregate, die die Messung negativ beeinflussen könnten, herausgefiltert. Die mit der NTA bestimmten durchschnittlichen Partikeldurchmesser sind somit kleiner als die mit der DLS ermittelten Durchmesser. Auch die Größenverteilung fällt insgesamt schmäler aus. Es ist allerdings festzuhalten, dass die Konzentration der verdünnten Proben, welche für die NTA verwendet wurden, eher der für die Versuche relevanten Konzentration entspricht, welche in weiteren Experimenten dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Eine unverdünnte, mit Fluorophor funktionalisierte NP enthaltende Lösung würde die Detektion und Beobachtung der einzelnen NP bei der Live-Mikroskopie und der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie aufgrund von Auto-Quenching-Phänomenen erschweren.

In den für die DLS-Messung verwendeten Ursprungsproben ist zum einen aufgrund der höheren Konzentration die Tendenz zur Aggregatbildung deutlich ausgeprägt, zum anderen können noch Staubpartikel oder andere Partikel in der Probe vorhanden sein, welche die Messung stören. Das vermehrte Vorhandensein von unterschiedlich großen Aggregaten neben den kleineren NP

in der Probe lässt die DLS multimodale Höchstwerte bestimmen, die im Endeffekt in einer extrem breiten Gauss-Verteilung zusammengefasst werden.

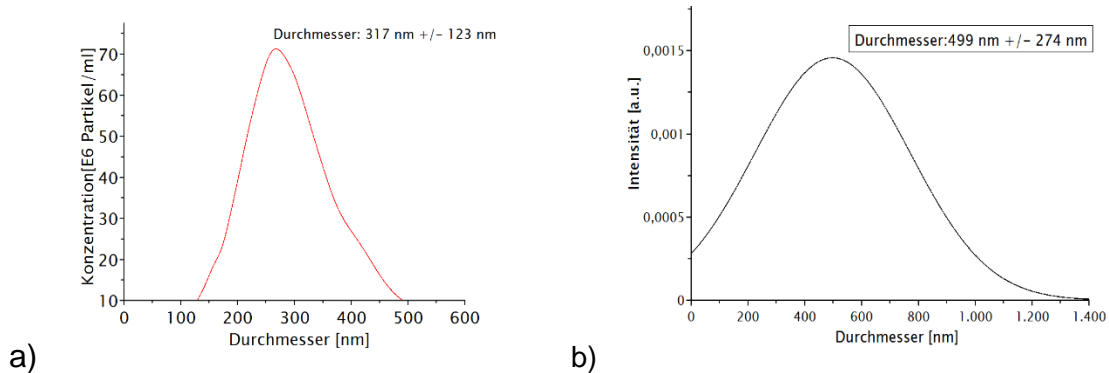
Die für die Charakterisierung mit der NTA vorbereiteten Proben werden durch Verdünnung und anschließende Verwendung eines Filters von bereits vorhandenen Aggregaten und großen Partikeln befreit. Dadurch wird die Konzentration der Proben verringert und einer Aggregatbildung vorgebeugt, was letztendlich auch in einer weniger breiten Größenverteilung resultiert. Dennoch macht auch eine Charakterisierung der NP mittels DLS Sinn, da insbesondere die Intensitäts-gewichtete Größenverteilung einen Hinweis auf die Homogenität der NP-Dispersionen geben kann.



**Abbildung 42:** Größenverteilung einer fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersion (NG680\_TAT\_2): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS

Die Auswertung der NTA- bzw. DLS-Messungen der fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersionen weist in dieselbe Richtung wie die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung der „Standard“-NP. Abbildung 42 zeigt beispielhaft die mittels NTA bzw. DLS ermittelten Größenverteilungen für NG680\_TAT\_2: Die mittels NTA ermittelte Verteilung ist relativ schmal (durchschnittlicher Durchmesser: 164 nm +/- 78 nm) und weist eine angedeutete Schulter bei ca. 200 nm auf. Bei der Auswertung der DLS-Messung fällt auch hier auf den ersten Blick auf, dass die Größenverteilung, wahrscheinlich aus denselben, oben

geschilderten Gründen, wesentlich breiter ist (durchschnittlicher Durchmesser 329 nm +/- 191 nm).



**Abbildung 43:** Größenverteilung einer nicht fluoreszenzmarkierten, nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition hergestellten NP-Lösung (NG\_MA\_2): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS

Auch die entsprechenden Messungen für die nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition synthetisierten NP (Abbildung 43 zeigt beispielhaft NG\_MA\_2) folgen dem oben beschriebenen Interpretationsmuster. Die NTA-Messung liefert eine im Vergleich zur DLS-Messung deutlich schmalere Verteilung mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 317 nm +/- 123 nm, während die Größenverteilung aus der DLS-Auswertung wesentlich breiter ausfällt (durchschnittlicher Durchmesser: 499 nm +/- 274 nm).

Da die NP-Dispersionen bei einem biologischen Einsatz allein durch die Injektion in einen tierischen Organismus stark verdünnt und größere Aggregate von Nicht-Fresszellen nur bedingt aufgenommen werden, sind die mit Hilfe der NTA an verdünnten Proben gewonnenen Charakterisierungsparameter für die weiteren Experimente dieser Arbeit von größerer Relevanz als die mit der DLS bestimmten Messergebnisse. Dennoch wurde auch eine Charakterisierung mit Hilfe der DLS durchgeführt, um einen Hinweis auf die Homogenität der NG zu erhalten.

Um einen besseren Vergleich beider Messmethoden zu ermöglichen, sollten die NP-Dispersionen in weiteren Untersuchungen vor der Messung gleich behandelt, bzw. die Proben vor der DLS-Messung zumindest gefiltert werden.

### 6.3.2 Größenverteilung bei unterschiedlichen Ausgangspolymeren

Bei der NP-Synthese kamen zwei unterschiedliche Ausgangspolymere zum Einsatz. Während zunächst noch das esterhaltige PG (PG<sub>EH</sub>-SH) für die Herstellung der NG verwendet wurde, erfolgte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit ein Wechsel zu esterfreiem PG (PG<sub>EF</sub>-SH). Die esterfreie Variante ist weniger anfällig gegenüber Hydrolyse, was sich positiv auf die Stabilität des Polymers auswirkt.

**Tabelle 34:** Partikelcharakterisierung vierer redox-sensitiver NP bei verschiedenen Ausgangspolymeren und Fluoreszenzfarbstoffen

Probe	Ausgangs-polymer	Mean [nm]	Mode [nm]	SD [nm]	Absolute Konzentration Messung 1 [Partikel/ml]	Absolute Konzentration Messung 2 [Partikel/ml]
NG680_4	PG <sub>EH</sub> -SH-AF680-2	149 ± 18	101 ± 16,8	74 ± 4,9	6,5*10 <sup>10</sup>	8,8*10 <sup>10</sup>
NGCy5_1	PG <sub>EF</sub> -SH-Cy5-1	242 ± 17	200 ± 21	122 ± 20	5,0*10 <sup>9</sup>	9,3*10 <sup>9</sup>
NG_2	PG <sub>EH</sub> -SH	172 ± 38	112 ± 39	103 ± 31	3,9*10 <sup>10</sup>	2,8*10 <sup>10</sup>
NG_3	PG <sub>EF</sub> -SH	180 ± 45	149 ± 188	73 ± 0	8,5*10 <sup>11</sup>	7,5*10 <sup>11</sup>

Tabelle 34 gibt noch einmal einen Überblick über die Ergebnisse der mit Hilfe der NTA durchgeführten Partikelcharakterisierung von vier mit unterschiedlichen Ausgangspolymeren synthetisierten, redox-sensitiven NP-Dispersionen. Betrachtet man die für die Partikelkonzentration ermittelten Werte, fällt auf, dass keine eindeutige Tendenz zu erkennen ist. Die esterfreien NG NG\_3 und NGCy5\_1 weisen mit durchschnittlich  $8 \cdot 10^{11}$  Partikeln/ml die höchste, bzw. mit durchschnittlich  $7,15 \cdot 10^9$  Partikeln/ml die niedrigste Partikelkonzentration auf,

wohingegen die esterhaltigen NG mit Partikelkonzentrationen zwischen  $3 \cdot 10^{10}$  Partikeln/ml und  $9 \cdot 10^{10}$  Partikeln/ml dazwischen liegen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, der unterschiedlichen Zusammensetzung der NG und, da keine direkten Vergleichsversuche mit  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$  und  $\text{PG}_{\text{EH-SH}}$  durchgeführt wurden, kann der Einfluss des Ausgangspolymers auf die Größenverteilung der NG nicht abschließend beurteilt werden. Um eine definitive Aussage über den Einfluss des Ausgangspolymers auf die Konzentration und die Partikelgröße treffen zu können, sollten vergleichende Untersuchungen mit NG, deren Zusammensetzung sich lediglich in dem für die Synthese verwendeten Prepolymer ( $\text{PG}_{\text{EH-SH}}$  oder  $\text{PG}_{\text{EF-SH}}$ ) unterscheidet, durchgeführt werden.

### 6.3.3 Größenverteilung markierter und unmarkierter Nanopartikel

#### 6.3.3.1 Unmarkierte redox-sensitive Nanogelee

Aufgrund der höheren Aussagekraft werden im Folgenden nur die Ergebnisse der NTA-Messungen näher betrachtet. Die unter 5.2.2.1 dargestellten Ergebnisse der Messungen für die unmarkierten redox-sensitiven NG NG\_2, NG\_3 und NG\_TAT\_1 (enthält zusätzlich das Transportprotein Tat) zeigen aufgrund ihrer einheitlichen Größenverteilung eine sehr gute Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der NG. In Abbildung 19 ist beispielhaft je eine Messung pro NP-Lösung graphisch dargestellt. Die Graphik verdeutlicht, dass die NG-Lösung im Fall von NG\_3 und NG\_TAT\_1 eine hohe Konzentration an NP mit einem Durchmesser von ca. 200 nm enthält. Die aufgrund der Auswertung berechneten durchschnittlichen Durchmesser der Verteilung liegen bei ca. 180 nm (NG\_3) bzw. ca. 210 nm (NG\_TAT\_1). Die maximale Größe der Partikel liegt in beiden Fällen bei ca. 350 nm. Die Verteilung von NG\_2 ist insgesamt etwas breiter, deutlich zu erkennen auch an der wesentlich größeren Standardabweichung von ca. 103 nm, und zentriert sich um einen mittleren Wert von ca. 150 nm (rechnerisch 172 nm). Es ist gut zu erkennen, dass die Größenverteilung relativ schmal und die Größe aller in den NG-Lösungen enthaltenen NP deutlich kleiner als 400 nm ist, was für die Reproduzierbarkeit der NG-Synthese spricht. Die



Konzentration der NP in den Proben lag bei ca.  $0,3 - 9,7 \cdot 10^{11}$  Partikeln/ml. Die Reproduzierbarkeit der Ansätze, die relative einheitliche und schmale Größenverteilung mit einem Hauptanteil  $< 300\text{nm}$  und die recht hohen Partikelkonzentrationen im Bereich von  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  Partikeln/ml unterstreichen das Potential dieses Typs von NG für biologische Anwendungen.

Auch im Folgenden soll die Eignung der synthetisierten NG bezüglich ihrer weiteren Verwendung anhand der Kriterien: Reproduzierbarkeit der Synthese, Einheitlichkeit der Verteilung, Partikelgröße  $< 300\text{ nm}$  und Partikelkonzentration im Bereich  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  Partikeln/ml beurteilt werden. Vergleiche hierzu auch Tabelle 22.

### **6.3.3.2 Nicht redox-sensitive Nanopartikel (ohne Fluorophor)**

#### *6.3.3.2.1 Via Michael-Addition hergestellte Nanopartikel*

Die Ergebnisse der NTA-Messungen sind in Abbildung 20 und Tabelle 23 dargestellt. Abbildung 20 zeigt ein deutlich unterschiedliches Größenspektrum für die beiden Ansätze NG\_MA\_1 und NG\_MA\_2. Während NG\_MA\_1 eine bimodale Größenverteilung mit Maxima bei ca.  $100\text{ nm}$  und  $260\text{ nm}$  aufweist (Mean:  $180 \pm 22\text{ nm}$ ), weist die Größenverteilung von NG\_MA\_2 lediglich ein Maximum bei ca.  $300\text{ nm}$  auf (Mean:  $331\text{ nm} \pm 42\text{ nm}$ ). Bei NG\_MA\_2 handelt es sich somit um eine besser charakterisierte, einheitlichere Spezies. Die Teilchenkonzentrationen liegen für beide Ansätze bei ca.  $3 - 6 \cdot 10^{10}$  Partikeln/ml, wobei die Werte für NG\_MA\_2 etwas höher liegen. Die graphisch dargestellten Messungen unterstreichen somit die in Tabelle 23 zusammengefassten Ergebnisse.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für die beiden Ansätze könnten darin begründet sein, dass bei NG\_MA\_2 die doppelte Menge an Vernetzer bei der Herstellung des NG eingesetzt wurde. Möglicherweise war die Umsetzung bei der Herstellung von NG\_MA\_1 nur unvollständig, so dass im Reaktionsgemisch zwei unterschiedliche NG-Spezies vorliegen. Bei der Weiterverfolgung dieses

Ansatzes zur Herstellung von nicht Stimuli-sensitiven bzw. nicht redox-sensitiven NP über Michael-Reaktion sollte somit der Einfluss der Menge an Vernetzer näher untersucht werden. Insgesamt erscheint NG\_MA\_2 aufgrund der relativ hohen Partikelkonzentration von ca.  $10^{10}$  Partikeln/ml und der einheitlichen Größenverteilung als geeignet für weitere Untersuchungen. Bezüglich der Reproduzierbarkeit bei der Herstellung lässt sich noch keine Aussage treffen. Als weniger vorteilhaft ist die relativ hohe mittlere Größe der Partikel von NG\_MA\_2 von  $331 \text{ nm} \pm 168 \text{ nm}$  zu werten.

#### *6.3.3.2.2 Via UV-Click-Reaktion hergestellte Nanopartikel*

Die Ergebnisse der durch eine UV-Click-Reaktion hergestellten NP sind in Tabelle 24 und Abbildung 21 zusammengefasst.

Beide NG NG\_Click\_1 und NG\_Click\_2 weisen bei der NTA-Messung eine wesentlich breitere Partikelgrößenverteilung mit mehreren Maxima als die bisher beschriebenen Ansätze auf. Es fällt auf, dass die Größenverteilung der in NG\_Click\_2 enthaltenen NP im Vergleich zu NG\_Click\_1 sichtlich breiter ist. Der durchschnittliche Durchmesser der einzelnen Partikel beträgt im Fall von NG\_Click\_1  $128 \text{ nm} \pm 82 \text{ nm}$ , im Fall von NG\_Click\_2  $184,3 \text{ nm} \pm 103 \text{ nm}$ . Während NG\_Click\_1 einen deutlichen Hauptpeak bei ungefähr  $90 \text{ nm}$  aufweist, sind für NG\_Click\_2 drei Spitzenwerte ausmachbar. Der erste und höchste Peak liegt bei ca.  $100 \text{ nm}$ , der zweite Peak ist bei ca.  $250 \text{ nm}$  zu erkennen. Der dritte und niedrigste Peak erhebt sich bei ca.  $500 \text{ nm}$ . Die Konzentration an in den Proben vorhandenen NP beträgt im Fall von NG\_Click\_2 nur etwa ein Drittel bis zur Hälfte der Konzentration von NG\_Click\_1. Die Ergebnisse der NTA-Messung weisen auf eine schlechte Reproduzierbarkeit der Click-Reaktion hin, die zudem zu schlecht definierten uneinheitlichen und relativ großen NP führt. Da außer der Aufarbeitung weitgehend identische Reaktionsbedingungen bei der Herstellung der beiden Chargen angewandt wurden, ist dieses Ergebnis ohne weitere Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit schlecht zu interpretieren. Auch die gemessene Partikelkonzentration im Bereich von  $10^8$  bis

$10^9$  Partikeln/ml liegt um eine bis zwei Größenordnungen unter den bei den anderen Ansätzen gemessenen Konzentrationen.

Aufgrund der großen Differenzen in der Größenverteilung und Konzentration zwischen den beiden NG-Lösungen ist aktuell nicht von einer zufrieden stellenden Reproduzierbarkeit der NP-Synthese über eine fotoinitierte UV-Click-Reaktion auszugehen. Sollte dieser Weg weiter verfolgt werden, bedarf dies einer Optimierung der Reaktionsbedingungen.

### **6.3.3.3 Mit Fluorophor markierte redox-sensitive Nanopartikel**

In Abbildung 22 und Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten redox-sensitiven NP mittels NTA aufgeführt. Abbildung 22 zeigt anschaulich, dass die NG-Lösungen NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 mit ca.  $6 - 9 \cdot 10^{10}$  Partikeln/ml eine um ca. den Faktor 10 höhere Partikelkonzentration aufweisen als die NG NGCy5\_1 und NGCy5\_TAT\_1 (ca.  $5 - 9 \cdot 10^9$  Partikel/ml). Die Partikelgrößenverteilungen von allen vier Proben sprechen mit jeweils einem Peak in der Verteilung für eine relative gute Reproduzierbarkeit und das Vorliegen von einheitlichen Spezies. Bei den mit dem Fluorophor Alexa Fluor 680 markierten NP liegt eine etwas breitere Größenverteilung vor als bei den mit Cy5 markierten Partikeln. Für NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 liegen die gemessenen Partikeldurchmesser zwischen 25 nm und 325 nm. Im Fall von NGCy5\_1 haben die kleinsten NP einen Durchmesser von ca. 100 nm, der Durchmesser der größten Partikel beträgt ungefähr 325 nm. Die in der NG-Lösung NGCy5\_TAT\_1 vorhandenen Partikel sind geringfügig größer. Die mit Hilfe der NTA ermittelten Partikeldurchmesser liegen in einem Bereich von 150 nm bis 350 nm. Für alle 4 Proben gilt, dass die einzelnen NP im Durchmesser kleiner als 350 nm sind. In den NG-Lösungen NG680\_4 und NG680\_TAT\_2 ist eine hohe Konzentration an NP mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm auszumachen. Für NGCy5\_1 liegt der Hauptpeak bei ca. 200 nm, für NGCy5\_TAT\_1 bei ca. 230 nm. Insgesamt sind diese NG aufgrund ihrer reproduzierbaren einheitlichen Größenverteilung mit einem Hauptanteil

< 300 nm und der relativ hohen Partikelkonzentration für weitere Untersuchungen als aussichtsreiche Kandidaten aus der Klasse der redox-sensitiven NG zu werten.

#### **6.3.3.4 Mit Fluorophor markierte, nicht redox-sensitive Nanopartikel (Michael-Addition)**

Abbildung 23 und Tabelle 26 fassen die Ergebnisse der Charakterisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, nicht Stimuli- bzw. nicht redox-sensitiven NP mittels NTA zusammen. Bei der Herstellung markierter, nicht Stimuli-sensitiver Partikel kam lediglich die Synthese via Michael-Addition zum Einsatz.

Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass es sich bei den mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 markierten NP NG680\_MA\_1 aufgrund der gemessenen bimodalen Größenverteilung nicht um eine einheitliche Spezies handelt. Der durchschnittliche Durchmesser der in der NG-Dispersion NG680\_MA\_1 vorhandenen Partikel beträgt  $165 \text{ nm} \pm 104,5 \text{ nm}$ , was den Anforderungen des gewünschten Einsatzgebiets entspräche. Die Partikelkonzentration liegt mit ca.  $2 \times 10^{10}$  Partikeln/ml im Bereich der für die anderen NG gefundenen Werte. NGCy7\_MA\_1 weist in der NTA-Messungen eine weitgehend einheitliche Verteilung um ein Maximum von ca. 70 nm und keine signifikanten Anteile  $> 170 \text{ nm}$  bei Partikelkonzentrationen um  $6 \times 10^{10}$  Partikeln/ml auf und erscheint somit als nicht degradierbares System für weitere Untersuchungen geeignet.

### **6.3.3.5 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung durch Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)**

Die Dynamische Lichtstreuung zählt zu den seit vielen Jahren etablierten Methoden der Analytik polymerer und kolloidaler Proben. Sie wird häufig zur Bestimmung der Größe von Partikeln in Lösung eingesetzt. Mit der DLS ist eine Charakterisierung von Partikeln im Teilchengrößenbereich von 3 nm bis zu 3 µm möglich. <sup>[98]</sup> Die DLS nutzt die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel für deren Größenbestimmung.

Wie oben beschrieben, sind die Ergebnisse der DLS-Messungen aufgrund der Messbedingungen und des möglichen Vorhandenseins von größeren Partikeln nicht so aussagekräftig wie die NTA-Messungen. Zusammenfassend kann bezüglich der Ergebnisse der DLS-Messungen gesagt werden:

1. Die DLS kann einen Hinweis auf die Homogenität der NP-Dispersionen liefern.
2. Verglichen mit den Ergebnissen der NTA-Messungen sind die durchschnittlichen NP-Durchmesser zu größeren Werten hin verschoben, was auf den erheblichen Einfluss großer Partikel und Aggregate auf die DLS-Messung zurückzuführen ist (vgl. Rayleigh-Streuung).

### **6.3.3.6 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Partikelcharakterisierung durch Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)**

Insgesamt lassen sich obige Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen: Der untersuchte, von PG-SH abgeleitete NP-Typ (NG\_1, etc., redox-sensitiv, unmarkiert) kann aufgrund seiner Einheitlichkeit, Partikelgröße und der Reproduzierbarkeit der Herstellung als gut geeignet für den geplanten Einsatz in biologischen Systemen beurteilt werden. Von den zusätzlich funktionalisierten NG erscheinen die folgenden aufgrund der oben geschilderten Kriterien als

besonders geeignet für den geplanten Einsatz in biologischen Systemen und weiterer Untersuchungen wert: NG680 und NG680\_TAT (redox-sensitiv, markiert), NGCy5 und NGCy5\_TAT (redox-sensitiv, markiert), NG\_MA\_2 (nicht redox-sensitiv, unmarkiert), NGCy7\_MA (nicht redox-sensitiv, markiert). Aufgrund des relativ hohen erreichbaren Markierungsgrades erscheinen die mit Cy5-markierten Verbindungen als besonders vorteilhaft.

#### **6.4 Stabilität von Nanopartikeln in biologischem Medium**

NP werden unter anderem mit dem Ziel der gezielten Medikamentenverabreichung hergestellt. <sup>[13-14]</sup> Für den Einsatz von NP als Wirkstoff- und DNA-Transportsysteme in einem biologischen Organismus zählt eine ausreichende Stabilität unter physiologischen Bedingungen, das heißt im Blut bei 37 °C, zu den unumgänglichen Voraussetzungen, damit die NP ihre Wirkung erst am gewünschten Zielort entfalten und nicht bereits auf dem Weg dorthin den Wirkstoff abgeben. Nur wenn die NP auf ihrem Weg zum Zielort durch den Organismus beständig sind und somit der Wirkstoff an die Partikel gebunden bleibt, kann eine regelrechte Funktion gewährleistet werden. Von daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit unter anderem auch die Untersuchung der Stabilität der verwendeten NP in biologischem Medium. Es galt zu untersuchen, ob und inwieweit sich die NP-Größe, deren Größenverteilung und die Konzentration der NP-Dispersionen unter physiologischen Bedingungen ändert, um erste Aussagen über die Stabilität der NP treffen zu können. Die Charakterisierung der NP erfolgte mit Hilfe der NTA.

Anfänglich wurde auch eine Charakterisierung der NP in Medium mit Hilfe der DLS in Erwägung gezogen, allerdings war eine DLS-Messung in DMEM aufgrund zu starker Streuung der im Medium vorhandenen Komponenten nicht möglich. Eine Wiederholung des Experimentes, bei dem die NP nach der Inkubation aus dem Medium heraus gewaschen und anschließend mit Hilfe der DLS charakterisiert werden, ist aber durchaus denkbar. So sind gegebenenfalls auch

kleinere Bestandteile, wie einzelne Polymere, nachweisbar, die der Charakterisierung mittels NTA entgehen würden.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit den mit redox-sensitiven NP durchgeführten Stabilitätsexperimenten. Im darauf folgenden Teil werden die Ergebnisse des Stabilitätsversuches, der mit den über eine Michael-Addition hergestellten NP realisiert wurde, dargelegt. Die Versuchsbedingungen waren für beide NP-Lösungen identisch.

#### **6.4.1 Stabilität redox-sensitiver Nanopartikel**

Um die Stabilität der redox-sensitiven NP zu untersuchen wurden jeweils 50  $\mu$ l einer redox-sensitiven NP-Lösung zu 2000  $\mu$ l Medium (DMEM) hinzugegeben und bei 37°C für unterschiedlich lange Zeit inkubiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der NP mit Hilfe der NTA zu verschiedenen Zeitpunkten.

##### **6.4.1.1 Veränderung der Größenverteilung der redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation**

Ein Indiz für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen ist ein über einen längeren Zeitraum konstanter Partikeldurchmesser. Mit Hilfe der NTA wurde die Veränderung der Partikelgröße im Verlauf von 14 Tagen untersucht. Zu jedem Zeitpunkt fanden mehrere Messungen statt. Die aus den jeweiligen Messungen gemittelten Werte für die redox-sensitiven NP sind in Tabelle 27 aufgeführt und in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Es ist lediglich eine leichte Vergrößerung des Partikeldurchmessers zu erkennen, die sich vor allem in den ersten 7 Tagen vollzieht. Insgesamt nimmt der mittlere NP-Durchmesser innerhalb von 14 Tagen um ca. 36 nm (entspricht 17 %; mittlerer Durchmesser: +36,2 nm; Hauptpeak: +34,5 nm) zu. Daraus lässt sich schließen, dass die NP unter physiologischen Bedingungen weitestgehend stabil sind.

Für eine Interpretation der gewonnenen Ergebnisse müssen unter anderem der Aufbau der NP und mögliche Wechselwirkungen der NP untereinander, mit Bestandteilen des Mediums und mit den Oberflächen der Versuchsgefäße berücksichtigt werden.

Wie im Verlauf der vorliegenden Arbeit bereits erwähnt worden ist, sind die Grundbausteine der verwendeten NP PG-Thiomere, die bei der Synthese der redox-sensitiven NP in inverser Miniemulsion mit Hilfe des Oxidationsmittels Alloxan unter Bildung von Disulfid-Brücken quervernetzt werden. Diese Disulfid-Brücken besitzen eine wichtige Rolle für die Funktion der redox-sensitiven NP, da sie bei Erreichen der Zielzelle durch das in jeder Säugetier-Zelle in reduzierter Form vorliegende Glutathion wieder zu Thiol-Gruppen reduziert werden sollen. <sup>[16]</sup> Allerdings stellen die Disulfid-Brücken auch potentielle Schwachstellen dar. So ist es durchaus denkbar, dass die Disulfid-Brücken Angriffspunkte für andere Reduktionsmittel oder Shuffling bieten. In dem verwendeten Medium liegen jedoch keine thiolhaltigen Komponenten vor, sodass ein Shuffling in diesem Fall keine Rolle spielt. Eine Vergrößerung des Partikeldurchmesseres ist in diesem Fall eher auf eine Aggregation der Partikel zurück zu führen.

Möglicherweise findet auch eine Art „Reifung“ der NP (analog einer Ostwald-Reifung bei Kristallen, entropischer Effekt) über die reversible Öffnung und Neubildung von Disulfidbrücken unter Bildung von größeren und thermodynamisch stabileren Aggregaten statt.

#### **6.4.1.2 Konzentrationsveränderung der redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation**

Die Konzentration der in einer NG-Lösung enthaltenen NP ist ein weiteres Indiz für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen. Eine konstante Partikelkonzentration spricht für die Stabilität der NP unter physiologischen Bedingungen, während eine Abnahme der Partikelkonzentration Hinweise auf einen Zerfall oder eine Aggregation der NP geben kann. Mit Hilfe der NTA wurde die Konzentration der in den Proben enthaltenen NP zum Zeitpunkt 0, nach 24 h,



48 h, 72 h, 120 h, 7 Tagen und 14 Tagen ermittelt. Die aus den jeweiligen Messungen gemittelten Werte für die redox-sensitiven NP sind in Tabelle 29 aufgeführt und in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Der Graphik in Abbildung 26 kann entnommen werden, dass die Konzentration der in der Probe befindlichen redox-sensitiven NP konstant über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen um ca. 60% abnimmt ( $- 8 \cdot 10^{11}$  Partikel/ml). Bei den oben beschriebenen Stabilitätsversuchen der redox-sensitiven NP wurde festgestellt, dass die Teilchengröße im Verlauf des Versuches tendenziell ansteigt. Die Frage ist, ob die Zunahme der Teilchengröße zu Kosten der Teilchenanzahl erfolgt. Berechnet man aus Teilchenanzahl und Teilchendurchmesser das Gesamtvolumen der in der Probe vorliegenden NP, so stellt man fest, dass dieses Gesamtvolumen im Verlauf von 14 Tagen um ca. 30 % abnimmt (Gesamtpartikelvolumen an Tag 0:  $1,15 \times 10^{19} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ; Gesamtpartikelvolumen an Tag 14:  $7,82 \times 10^{18} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ). Diese Art der Auswertung der Versuchsergebnisse zeigt weiterhin, dass es sich bei den Messwerten nach 2 Tagen um einen Ausreißer handeln muss. Das Ergebnis, dass die Partikelkonzentration im Verlauf der Untersuchung um ca. 60 % abnimmt während gleichzeitig das Gesamtvolumen der in der Probe vorliegenden NP lediglich um 30 % abnimmt, untermauert weiterhin, dass bei den untersuchten redox-sensitiven Partikeln eine gewisse Alterung mit gleichzeitiger Vergrößerung der Partikel stattfindet.

Die darüber hinaus gehende Abnahme der Partikelkonzentration könnte sich durch mögliche Wechselwirkungen der NP mit den Oberflächen der Versuchsgefäße erklären lassen. <sup>[99]</sup>

#### **6.4.2 Stabilität der über eine Michael-Addition hergestellten Nanopartikel**

Das Experiment zur Erforschung der Stabilität der über eine Michael-Addition hergestellten NP erfolgte auf dieselbe Art und Weise wie die Untersuchung der Beständigkeit der redox-sensitiven NP. Die Ergebnisse des Stabilitätsversuches sind in den Abbildungen 25 und 27 aufgeführt und in den Tabellen 28 und 30 zusammengefasst.

##### **6.4.2.1 Veränderung der Größenverteilung der nicht Stimuli-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation**

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung bezüglich ihrer Partikelgröße der über Michael-Addition hergestellten nicht Stimuli-sensitiven NP sind in Tabelle 28 bzw. in Abbildung 25 zusammengefasst.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass der Partikeldurchmesser für die ersten sieben Tage innerhalb der Fehlerbreite praktisch konstant bleibt. Für den Zeitraum zwischen Tag 7 und Tag 14 ist eine Abnahme des mittleren Durchmessers von ca. 240 nm (entspricht der durchschnittlichen Größe von Tag 1 bis 7) auf ca. 150 nm zu verzeichnen (-37,5 %).

Da es sich bei den in diesem Fall untersuchten Partikeln um nicht Stimuli-sensitive NP handelt, ist es schwierig eine zufriedenstellende Erklärung für die doch deutliche Verkleinerung des Partikeldurchmessers und die Abnahme der Partikelkonzentration zu finden. Geht man davon aus, dass die Partikel unter den Versuchsbedingungen chemisch stabil sind, könnte es sich bei der beobachteten Abnahme um eine selektive Adsorption größerer Partikel an Oberflächen der Versuchsanordnung handeln. Allerdings ist zu beachten, dass der bei der NP-Synthese eingesetzte Crosslinker PEGDA einen Ester enthält, welcher Hydrolyse-anfällig ist, und weiterhin die für die Verlinkung genutzte doppelte Michael-Addition prinzipiell reversibel ist. Es wäre also denkbar, dass die über eine Michael-Addition hergestellten NP eine geringere Lagerstabilität besitzen als zu Beginn dieser Arbeit angenommen, indem sie bei längerer Lagerung einer

teilweisen Hydrolyse der Esterfunktionen bzw. einer Retro-Michael-Reaktion unterliegen, was zu einem Zerfall der Partikel in einzelne Polymere und kleinere Partikel führen würde.

#### **6.4.2.2 Konzentrationsveränderung der nicht redox-sensitiven Nanopartikel bei 14-tägiger Inkubation**

Tabelle 30 und Abbildung 27 fassen die Ergebnisse des Stabilitätsexperiments, die Partikelkonzentration betreffend, für die nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP zusammen.

Abbildung 27 zeigt, dass die Konzentration der in der Probe befindlichen nicht Stimuli-sensitiven NP über den gesamten Versuchszeitraum wesentlich stärker abnimmt (ca.  $-1,7 \cdot 10^{11}$  Partikel/ml bzw. um ca. 90% nach 14 Tagen) als die entsprechende Konzentration der redox-sensitiven NP. Berechnet man das Gesamtvolumen der in der Probe vorliegenden Partikel, sieht man, dass dieses sich nach 7 Tagen praktisch halbiert hat (Gesamtpartikelvolumen an Tag 0:  $1,35 \times 10^{18} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ; Gesamtpartikelvolumen an Tag 7:  $6,49 \times 10^{17} \text{ nm}^3/\text{ml}$ ). Aufgrund der Auswertung scheint es sich bei den Messwerten nach 1 und 2 Tagen um Ausreißer zu handeln. Es ist nicht plausibel, dass sich die Anzahl bzw. das Gesamtvolumen der Partikel ohne äußeren Einfluss verringert und anschließend spontan wieder ansteigt.

Die drastische Abnahme der Konzentration der nicht Stimuli-sensitiven NP bei längerer Inkubation im Vergleich zu der Konzentration der redox-sensitiven NP, könnte durch die oben schon diskutierte Hydrolyse-Anfälligkeit des im Linker PEGDA enthaltenen Esters bzw. durch das Auftreten von Retro-Michael-Additionsreaktionen erklärt werden. Die für die Stabilitätsexperimente verwendeten redox-sensitiven NP hingegen enthalten, da sie aus dem esterfreien PG (PG<sub>EF</sub>-SH) synthetisiert und oxidativ quervernetzt wurden, keine Hydrolyse-labilen Komponenten. Eine weitere Begründung für die gemessenen Konzentrationsabnahmen könnte in möglichen Adsorptionprozessen an die

Oberflächen der verwendeten Apparate zu finden sein. Die beobachteten Ausreißer bei der Messung deuten darauf hin, dass es bei längerem Lagern ohne aktive Durchmischung zu ungleichmäßigen Verteilungen der NG im Medium kommen kann, so dass man bei der Probenahme keine für das Gesamtmessgut repräsentative Probe zieht. Insgesamt nimmt das Gesamtpartikelvolumen bei den über eine Michael-Addition hergestellten NG um den Faktor 10 ab während dieses bei den redox-sensitiven NG nur um den Faktor 3 abnimmt.

#### **6.4.3 Ausblick**

Um die Beständigkeit sowohl der Stimuli-sensitiven als auch der nicht Stimuli-sensitiven NP unter physiologischen Bedingungen endgültig zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Neben der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der NTA sollte eine andere Methode zur Ermittlung der Konzentration Anwendung finden, um einen Vergleichswert zu schaffen. Auch die Charakterisierung der NP sollte neben der Charakterisierung mittels NTA auf eine zusätzliche Art und Weise erfolgen.

Für die redox-sensitiven NP würde sich auch ein Nachweis freier Thiole anbieten. Bei einem Zerfall der NP lösen sich die Disulfidbrückenbindungen unter Bildung freier Thiol-Gruppen. Stabilitätsuntersuchungen in anderen Puffersystemen sowie in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von redox-aktiven Spezies (SH-Gruppen) bieten sich außerdem an.

## 6.5 Wechselwirkungen von redox-sensitiven Nanopartikeln mit Bovinem Serumalbumin

Es gibt bereits zahlreiche Veröffentlichungen, die eine Interaktion von Gold- und anderen polymeren NP mit im Blut vorkommenden Proteinen belegen und diskutieren. <sup>[81]</sup> <sup>[100]</sup> Daher wurden auch die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten redox-sensitiven NP hinsichtlich einer Wechselwirkung mit Blutbestandteilen untersucht. Da Serumalbumin mit einer Blutkonzentration von 35 – 53 mg/ml den größten Anteil an den im Blut vorhandenen Proteinen darstellt, eignet es sich besonders für Wechselwirkungs-Studien.

Es gibt bereits einige Studien, die sich mit der Frage beschäftigen, ob Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen des Blutes, im Speziellen zwischen Blutplasmaproteinen und NP bestehen. Diese Untersuchungen belegen, dass es sehr wohl zu einer Protein-Adsorption an NP kommt, in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. <sup>[81]</sup> <sup>[82]</sup> Grundsätzlich muss eine vorhandene Protein-NP-Interaktion aber kein negatives Ereignis sein. Es ist durchaus denkbar, dass die NP durch an deren Oberfläche adsorbierte Proteine vor einem frühzeitigen Abbau durch Makrophagen, aber auch durch im Organismus vorkommende Reduktionsmittel, geschützt werden. Ungünstig ist es allerdings, wenn die Protein-Hülle ein Eindringen der NP in die Zielzelle verhindert. Auch im Fall der in dieser Arbeit verwendeten redox-sensitiven NP galt das Interesse einer möglichen Interaktion mit den im Blutplasma vorkommenden Proteinen. Dabei war es zunächst wichtig die Frage zu klären, ob grundsätzlich Wechselwirkungen beobachtet werden können.

Im folgenden Abschnitt wird ein grundlegendes Experiment diskutiert, welches klären sollte, ob überhaupt eine Protein-Adsorption an redox-sensitive NP stattfindet.

### 6.5.1 Protein-Adsorption an redox-sensitive Nanopartikel

Ziel war es zunächst, mit einem relativ einfachen Versuchsaufbau erste Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Protein-NP-Interaktion zu gewinnen. Für diese erste Untersuchung wurde eine mit Cy5-NHS-Ester funktionalisierte BSA-Lösung in 0,1 M PBS-Puffer hergestellt und mit drei unterschiedlichen, nicht markierten NP-Lösungen gemischt. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Anhand des gemessenen Wertes am Anregungsmaximum (646 nm) und einer zuvor mit einer BSA-Cy5-NHS-Ester-Lösung erstellten Kalibriergerade konnte dann die Proteinkonzentration im Überstand kalkuliert werden. Basierend auf der im Überstand vorhandenen Proteinkonzentration und der zu Beginn des Experiments eingesetzten Menge an BSA wurde abschließend die Menge des an die redox-sensitiven NP adsorbierten BSA berechnet.

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie der Proben-Überstände nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 14000 rpm graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die höchsten Extinktionswerte für alle 3 Proben im Bereich des Anregungsmaximums bei 646 nm liegen. Wie bereits in Kapitel 5.4.1 erläutert, machen die negativen Extinktionswerte der Proben keinen physikalischen Sinn. Offensichtlich absorbiert die Referenzprobe, eine reine NP-Lösung, im gesamten gemessenen Bereich stärker als die Überstände der zentrifugierten Proben aus den Versuchen. Offenbar werden bei der Zentrifugation der NG/BSA-Proben die NP zusammen mit dem BSA weitgehend sedimentiert. Der Überstand der zentrifugierten Proben ist somit im Vergleich mit der Referenzprobe (NG-Lösung, nicht zentrifugiert) optisch weniger dicht, was zu der beobachteten negativen Extinktion führt. Aufgrund der Tatsache, dass negative Extinktionswerte gemessen wurden, war eine Auswertung der Messung nur nach einer Nulllinienkorrektur möglich. Zur Konzentrationsbestimmung des nicht gebundenen Fluorophors im Überstand und somit der Bestimmung der an die NP adsorbierten Proteinmenge wurden die in Abbildung 28 gezeigten Extinktionsspektren entlang der y-Achse in positive

Richtung verschoben, so dass die Extinktionswerte - wie zu erwarten wäre - für den Bereich 700 – 800 nm bei 0 liegen. Tabelle 31 fasst die Ergebnisse der Berechnungen basierend auf einem Extinktionswert von 0,015 bzw. 0,020 zusammen.

Bei allen drei Proben ist mehr als die Hälfte des Proteins infolge von Adsorption an die NG-Partikel aus der Lösung abgeschieden worden. D.h. unter diesen Bedingungen, bei BSA-Konzentrationen von ca.  $8,3 \mu\text{g/ml}$  ( $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ g/ml}$ ) Gesamtlösung, mit einem Verhältnis NG-Partikel zu BSA von  $10 \mu\text{g BSA pro } 1000 \mu\text{l NG-Lösung}$  bzw. ca.  $3 \times 10^9$  bis  $5 \times 10^{10}$  Partikeln pro  $\mu\text{g BSA}$  findet eine Ausfällung des Proteins von über 50 % statt. Die in Tabelle 31 aufgeführten Ergebnisse belegen, dass an alle in dieser Arbeit untersuchten NP eine Proteinadsorption und damit Veränderung der Oberflächenstruktur des BSA stattfindet, unabhängig von der Tatsache, ob sie das Zell-Aufnahme-Protein Tat enthalten oder nicht. Dabei werden im Fall von NG\_ 3 ca. die Hälfte der eingesetzten BSA-Menge, im Fall der anderen beiden NG sogar zwei Drittel aller Proteine adsorbiert. Diese Messergebnisse können zusätzlich mit den während der experimentellen Phase gemachten Beobachtungen untermauert werden: nach dem Zentrifugieren der NG-BSA-Lösung ist am Boden des Eppendorf-Safe-Lock-Gefäßes ein blau eingefärbtes Pellet deutlich zu erkennen, der Überstand hat hingegen seine Blaufärbung verloren. Um diese Beobachtungen zu überprüfen wurde auch eine reine BSA-Lösung unter denselben Bedingungen wie die NG-BSA-Lösung zentrifugiert. Dabei konnte keine Pellet-Bildung verzeichnet werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mit Hilfe eines ersten relativ einfachen Experimentes eine Proteinadsorption an redox-sensitive NP nachgewiesen werden konnte. Ob es sich dabei aber tatsächlich um eine Adsorption (Chemisorption oder Physisorption) der BSA-Moleküle an der NP-Oberfläche oder eine Absorption des BSA in das dreidimensionale Polymernetzwerk der NP handelt, lässt sich mit Hilfe dieses Experiments nicht klären. Auch darüber, ob diese Proteinadsorption gute oder schlechte Auswirkungen auf die Stabilität und die Zellaufnahme der NP hat, kann nicht geurteilt werden. Des Weiteren ist zu beachten, dass bei diesem Versuch mit

einer BSA-Konzentration von 8,3 µg/ml gearbeitet wurde, welche weit unter der im menschlichen Organismus vorkommenden Konzentration von 35-53 mg/ml Blutserum liegt. Es bleibt also die Frage zu klären, inwieweit sich eine höhere, den physiologischen Bedingungen nähere Proteinkonzentration auf die Proteinadsorption an redox-sensitive NP auswirkt. Übersteigt die Proteinadsorption bei höherer Proteinkonzentration den gefundenen Wert von ca. 67% noch oder tritt bei ca. 67 % eine Sättigung ein, unabhängig von der Konzentration an zugegebenem BSA? Insofern gilt das Interesse in Zukunft weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet, unter anderem unter Verwendung physiologischer Reaktionsbedingungen mit physiologischen BSA-Konzentrationen.

## **6.6 In Vitro-Fluoreszenz-Mikroskopie**

Für den erfolgreichen Einsatz der NP als Wirkstofftransportsystem ist es essenziell, dass die NP von den Zielzellen auch aufgenommen werden können. Deshalb galt während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit unter anderem auch das Interesse der Untersuchung des Aufnahmeprozesses redox-sensitiver NP, die teilweise das Zellaufnahmeprotein Tat enthielten. Getestet wurde der Aufnahmeprozess in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik am Biozentrum der Universität Würzburg an HeLa-Zellen.

Eine erste Untersuchung beschäftigt sich ganz allgemein mit der Aufnahme der Tat-funktionalisierten und nicht Tat-funktionalisierten NP in die Zellen. Dabei sollte nicht nur die Zellaufnahme nachgewiesen, sondern auch der Zellaufnahmemechanismus genauer beschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit galt bei den Untersuchungen zum Zellaufnahmemechanismus das Hauptinteresse den redox-sensitiven NP. Verglichen wurde die Zellaufnahme von NP mit und ohne Fusionsprotein.



### 6.6.1 Tat- und AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel

Die Abbildungen 30-32 zeigen bei der Live-Cell-Mikroskopie mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops und einer Kamera angefertigte Momentaufnahmen der HeLa-Zellen nach unterschiedlich langer Inkubation mit Tat-funktionalisierten, redox-sensitiven NP. Die deutlich erkennbaren hellen Punkte in den Aufnahmen entsprechen den fluoreszierenden NP. Der größte Anteil der Fluoreszenz konzentriert sich augenscheinlich auf kleine Vesikel, die in der ersten Aufnahme nach einstündiger Inkubation hauptsächlich am Rand der Zellen lokalisiert sind. Nach zweistündiger Inkubation befindet sich ein Großteil der die fluoreszierenden NP enthaltenden Bläschen noch immer an bestimmten Ecken der Zelle. Es hat allerdings scheinbar auch eine Wanderung der Vesikel in Richtung Zellinneres eingesetzt.

Den Momentaufnahmen nach vierstündiger Inkubation ist zu entnehmen, dass sich der Wanderungstrend der fluoreszierenden Vesikel in Richtung Zellinneres fortsetzt. Zwar findet sich eine Vielzahl der Vesikel noch immer am Rand der Zellen, dennoch sind deutlich vermehrt NP enthaltende Vesikel im Cytoplasma auszumachen.

Abbildung 32 zeigt Momentaufnahmen nach achtstündiger Inkubation mit Tat- und AF680-funktionalisierten, redox-sensitiven NP. Im Vergleich zu den Aufnahmen nach zweistündiger Inkubation ist die Fluoreszenz und somit auch die Konzentration an NP im Cytoplasma höher, wobei ein Vordringen in den Zellkern nicht beobachtet werden kann. Der Bereich des Zellkerns bleibt dunkel. Die Partikel befinden sich auch nach 8 Stunden noch in den Vesikeln, was gegen eine Freisetzung der Partikel aus den Vesikeln und den Zerfall der NP zur Freisetzung des Wirkstoffes spricht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mit Tat funktionalisierten redox-sensitiven NP von den Zellen aufgenommen werden. Es ist davon auszugehen, dass NP via Endozytose in die HeLa-Zellen transportiert werden. Ein Indiz für diese Vermutung ist die deutlich erkennbare Vesikelbildung, die in manchen Bereichen der Plasmamembran verstärkt beobachtet werden kann. Für

die Aufnahme der Partikel durch Endozytose spricht auch das Ablösen der Vesikel von der Zellmembran und die Wanderungstendenz der die NP enthaltenden Vesikel Richtung Zellinneres. Der genaue Vorgang der Vesikelbildung und –ablösung konnte aber noch nicht aufgezeichnet werden.

### **6.6.2 AF680-funktionalisierte, redox-sensitive Nanopartikel ohne Fusionsprotein Tat**

In Abbildung 33 sind zwei während der Live-Cell-Mikroskopie festgehaltene Momentaufnahmen der HeLa-Zellen nach eindreiviertelstündiger und nach vierstündiger Inkubation mit redox-sensitiven NP, die kein Fusionsprotein enthalten, dargestellt. Die Qualität der Aufnahmen wird durch eine Aggregatbildung der NP verringert, da es zu einem relativ starken Hintergrundleuchten kommt, welches die Fluoreszenz der einzelnen NP teilweise überlagert. Dennoch können einzelne fluoreszierende Punkte in Lösung detektiert werden, die den einzelnen NP entsprechen. Ein hoher Weißabgleich lässt bei diesen Aufnahmen den Eindruck einer scheinbar hohen Fluoreszenzintensität entstehen. NP enthaltende Vesikel, wie sie bei den Tat-funktionalisierten Proben vorkommen, können nicht wahrgenommen werden. Diese Beobachtung lässt zunächst den Schluss zu, dass das Zellaufnahmepeptid Tat für die Zellaufnahme der NP unerlässlich ist. In bestimmten Bereichen der Plasmamembran ist jedoch eine Vesikelbildung zu erkennen, so dass abschließend nicht deutlich gesagt werden kann, ob es zu einer Aufnahme kommt oder nicht. Möglicherweise kommt es zu einer stark reduzierten Aufnahme verglichen mit der Aufnahme der mit Tat funktionalisierten NP.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung fluoreszent markierter Präpolymere sowie deren Optimierung, die kontrollierte und reproduzierbare Synthese von redox-sensitiven und nicht redox-sensitiven NG mit und ohne Fluoreszenzmarkierung in einem durchschnittlichen Partikelgrößenbereich von 150 – 300 nm und mit einer Konzentration  $> 10^{10}$  Partikel/ml, die Charakterisierung der NG, ihre Untersuchung bezüglich ihrer Stabilität und des Assoziationsverhaltens zu BSA sowie die Erlangung von Erkenntnissen bezüglich des Aufnahmemechanismus der NG in Abhängigkeit vom Transportpeptid Tat.

Abschließend kann zusammenfassend gesagt werden:

1. Das große Potential von PG-basierten NG für biologische bzw. medizinische Einsatzgebiete konnte weiter untermauert werden.
2. Das mit Cy5-Alkin markierte PG PG-SH-Cy5 erscheint aufgrund des relativ hohen erreichten Markierungsgrades bei der Herstellung als aussichtsreichster Kandidat für weitere Untersuchungen. Diese Umsetzung besitzt noch Optimierungspotentiale bezüglich einer Verringerung des Polymerverlusts bei der Aufarbeitung, des erreichbaren Markierungsgrades und der Markierungsausbeute. Möglichkeiten, dies zu erreichen, wurden diskutiert.
3. Klare Aussagen über den Einfluss des esterhaltigen bzw. esterfreien Ausgangspolymers PG-SH auf die Konzentration und die Partikelgröße konnten aufgrund einer nicht ausreichenden Datenlage nicht getroffen werden.
4. Die esterhaltigen PG-SH-Moleküle erscheinen aufgrund ihrer Labilität gegenüber Hydrolyse für die NP-Synthese weniger geeignet (geringere Stabilität).
5. Die Charakterisierung der aus den markierten und unmarkierten Ausgangspolymeren hergestellten NG, welche teilweise zusätzlich mit dem

Transportpeptid Tat funktionalisiert wurden, erfolgte mittels NTA und zeigt für die meisten Spezies relativ schmale, gut definierte, monomodale Größenverteilungen mit einem Maximum um 100-200 nm im Bereich von ca. 40 – max. 400 nm mit Partikelkonzentrationen im Bereich von  $10^{10}$  -  $10^{11}$  Partikeln/ml.

6. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der untersuchte, von PG-SH abgeleitete NP-Typ (z. B. NG\_3, redox-sensitiv unmarkiert) aufgrund seiner Einheitlichkeit, Partikelgröße und der Reproduzierbarkeit der Herstellung als gut geeignet für den geplanten Einsatz in biologischen Systemen erscheint. Von den weiter derivatisierten NG erscheinen die folgenden aufgrund der oben geschilderten Kriterien als besonders geeignet für den geplanten Einsatz in biologischen Systemen und weiterer Untersuchungen wert: NG680\_(TAT)\_1-4 (redox-sensitiv, markiert), NGCy5\_(TAT)\_1 (redox-sensitiv, markiert), NG\_MA\_2 (nicht redox-sensitiv, unmarkiert), NGCy7\_MA\_1 (nicht redox-sensitiv, markiert). Aufgrund des relativ hohen erreichbaren Markierungsgrades bei der Markierung der Ausgangspolymere erscheinen die mit Cy5-markierten Verbindungen als besonders vorteilhaft.
7. Die esterfreien, redox-sensitiven NP erwiesen sich bei 14-tägiger Lagerung unter physiologischen Bedingungen als stabil. Ihre Konzentration nahm über 14 Tage um ca. 60 % vom Ausgangswert ab. Gleichzeitig nahm der Teilchendurchmesser während des Beobachtungszeitraums um ca. 25 % zu. Die Abnahme der Teilchenzahl ist - zumindest teilweise - durch eine Vergrößerung des mittleren Teilchendurchmessers und mögliche Adsorptionseffekte an die Gefäßwände des Versuchsaufbaus zu erklären.
8. Die Konzentration der esterfreien, nicht redox-sensitiven NP verringert sich bei 14-tägiger Inkubation unter physiologischen Bedingungen deutlich auf ca. 10 % des Ausgangswerts. Der mittlere Durchmesser der Partikel bleibt innerhalb des Untersuchungszeitraums innerhalb der Fehlergrenzen konstant. Die starke Abnahme der Partikelkonzentration ist wahrscheinlich auf die Hydrolyse des verwendeten esterhaltigen Crosslinkers PEGDA zurückzuführen. Desweiteren sind Adsorptionsphänomene an Oberflächen

des Versuchsaufbaus nicht auszuschließen. Insgesamt hervorzuheben ist die wesentlich höhere Stabilität der redox-sensitiven NP unter den Versuchsbedingungen. Diese Substanzklasse sollte daher weiter verfolgt werden.

9. Es wurde gezeigt, dass sowohl die NG, die das Aufnahmeprotein Tat enthalten, als auch die NG ohne Tat mit Fluoreszenz-markiertem BSA (8,3 µg/ml) wechselwirken und zusammen mit diesem bei der Zentrifugation abgeschieden werden. Über die Art der Wechselwirkung kann keine Aussage getroffen werden.
10. Durch in vitro Zellaufnahmeuntersuchungen an Hela-Zellen konnte gezeigt werden, dass die mit Tat funktionalisierten, redox-sensitiven, Fluoreszenz-markierten NP von den Zellen aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt über eine deutlich erkennbare Vesikelbildung, die an der Plasmamembran verstärkt beobachtet werden kann. Im Gegensatz hierzu konnte bei den nicht mit Tat funktionalisierten NP keine vergleichbare in vitro Zellaufnahme beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen insgesamt das große Potential der von Thiol-funktionalisierten PG abgeleiteten NG für die medizinische Forschung und zukünftige Anwendungen in der Diagnostik und Therapie. Es wird eine Reihe von Ansatzpunkten aufgezeigt, auf deren Basis weitere vertiefende Untersuchungen zur Charakterisierung und Optimierung sowie zu zukünftigen nutzbringenden Anwendungen vorgenommen werden sollten.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] S. Smriti, PhD thesis, RWTH Aachen (Aachen), **2014**.
- [2] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, *International journal of nanomedicine* **2009**, *4*, 99.
- [3] J. Groll, S. Singh, K. Albrecht, M. Moeller, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 5543-5549.
- [4] H. Paschen, C. Coenen, T. Fleischer, R. Grünwald, D. Oertel, C. Revermann, *Kapitel 2: Begriffe und Grundlagen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2004**.
- [5] B. S. I. (BSI), (Ed.: B. S. I. (BSI)), British Standards Institution (BSI), <https://archive.org/details/bs.pas.71.2005>, **2005**.
- [6] J. A. Hubbell, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **1998**, *3*, 246-251.
- [7] A. S. Hoffman, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 3-12.
- [8] M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nat Nanotechnol* **2007**, *2*, 469-478.
- [9] C. Damge, C. Michel, M. Aprahamian, P. Couvreur, *Diabetes* **1988**, *37*, 246-251.
- [10] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 135-147.
- [11] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 271-284.
- [12] R. Haag, F. Kratz, *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 1218-1237.
- [13] A. V. Kabanov, S. V. Vinogradov, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48*, 5418-5429.
- [14] S. Rigogliuso, M. A. Sabatino, G. Adamo, N. Grimaldi, C. Dispenza, G. Gherzi, *CHEMICAL ENGINEERING* **2012**, *27*.
- [15] K. Albrecht, M. Moeller, J. Groll, in *Chemical Design of Responsive Microgels, Vol. 234* (Eds.: A. Pich, W. Richtering), Springer Berlin Heidelberg, **2011**, pp. 65-93.
- [16] S. Singh, I. Zilkowski, A. Ewald, T. Maurell-Lopez, K. Albrecht, M. Möller, J. Groll, *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13*, 470-482.
- [17] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1638-1649.
- [18] U. Jonas, P. Theato, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 1955-1965.
- [19] A. D. Jenkins, P. Kratochvíl, R. F. T. Stepto, U. W. Suter, in *Pure and Applied Chemistry, Vol. 68*, **1996**, p. 2287.
- [20] S. Vinogradov, E. Batrakova, A. Kabanov, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 291-304.
- [21] J. P. Rolland, B. W. Maynor, L. E. Euliss, A. E. Exner, G. M. Denison, J. M. DeSimone, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 10096-10100.
- [22] P. J. Dowding, B. Vincent, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *161*, 259-269.
- [23] J. L. Gardon, *British Polymer Journal* **1970**, *2*, 1-12.
- [24] H. Fikentscher, H. Gerrens, H. Schuller, *Angewandte Chemie* **1960**, *72*, 856-864.
- [25] K. Köhler, P. D. I. H. P. Schuchmann, *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*, Behr's Verlag, **2012**.
- [26] D. Crespy, K. Landfester, *Beilstein journal of organic chemistry* **2010**, *6*, 1132-1148.

- [27] K. Landfester, A. Musyanovych, in *Chemical Design of Responsive Microgels*, Vol. 234 (Eds.: A. Pich, W. Richtering), Springer Berlin Heidelberg, **2011**, pp. 39-63.
- [28] H. Priya James, R. John, A. Alex, K. Anoop, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2014**.
- [29] L. Brulisauer, M. A. Gauthier, J. C. Leroux, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, 195, 147-154.
- [30] M. I. Ltd, <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>, **2009**.
- [31] M. I. Ltd., Malvern Instruments Ltd., [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf), **2004**.
- [32] H. I. Inc., Horiba Instruments Inc., [https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/PSA\\_Guid ebook.pdf](https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/PSA_Guid ebook.pdf), **2014**.
- [33] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, *Pharmaceutical research* **2010**, 27, 796-810.
- [34] R. A. Dragovic, C. Gardiner, A. S. Brooks, D. S. Tannetta, D. J. Ferguson, P. Hole, B. Carr, C. W. Redman, A. L. Harris, P. J. Dobson, P. Harrison, I. L. Sargent, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2011**, 7, 780-788.
- [35] A. Malloy, B. Carr, *Particle & Particle Systems Characterization* **2006**, 23, 197-204.
- [36] B. Carr, M. Wright, (Ed.: N. S. Ltd), **2013**.
- [37] S. R. Saptarshi, A. Duschl, A. L. Lopata, *Journal of nanobiotechnology* **2013**, 11, 26.
- [38] N. Bertrand, J.-C. Leroux, *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, 152-163.
- [39] J. Zervos-Kopp, *Anatomie, Biologie und Physiologie*, Thieme, **2009**.
- [40] R. Mahlberg, A. Gilles, A. Läsch, *Hämatologie: Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe*, Wiley, **2014**.
- [41] G. Steffers, S. Credner, *Allgemeine Krankheitslehre und Innere Medizin für Physiotherapeuten*, Thieme, **2011**.
- [42] G. J. Quinlan, G. S. Martin, T. W. Evans, *Hepatology* **2005**, 41, 1211-1219.
- [43] D. Carter, X. He, S. Munson, P. Twigg, K. Gernert, M. Broom, T. Miller, *Science (New York, N.Y.)* **1989**, 244, 1195-1198.
- [44] A. Atala, R. P. Lanza, *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press, **2002**.
- [45] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, 358, 209-215.
- [46] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Engineering* **1999**, 12, 439-446.
- [47] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life* **2005**, 57, 787-796.
- [48] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Molecular Immunology* **2012**, 52, 174-182.
- [49] I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, 3, 40-47.
- [50] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi, *Chem Rev* **2013**, 15, 5610-5637.
- [51] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, 61, 428-437.
- [52] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science (New York, N.Y.)* **1972**, 175, 720-731.
- [53] J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann, R. Netzker, *Duale Reihe Biochemie*, 2 ed., Georg Thieme Verlag, **2008**.
- [54] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, 422, 37-44.

- [55] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Vol. 3. Auflage*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
- [56] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the cell, Vol. 5*, Garland Science, Taylor & Francis Group, United States of America, **2008**.
- [57] M. K. Pratten, J. B. Lloyd, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1986**, 881, 307-313.
- [58] S. Falcone, E. Cocucci, P. Podini, T. Kirchhausen, E. Clementi, J. Meldolesi, *Journal of Cell Science* **2006**, 119, 4758-4769.
- [59] J. A. Swanson, C. Watts, *Trends in cell biology* **1995**, 5, 424-428.
- [60] J. A. Swanson, S. C. Baer, *Trends in Cell Biology* **1995**, 5, 89-93.
- [61] J. A. Swanson, *J Cell Sci* **1989**, 94 ( Pt 1), 135-142.
- [62] L. J. Hewlett, A. R. Prescott, C. Watts, *J Cell Biol* **1994**, 124, 689-703.
- [63] R. Lüllmann-Rauch, F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie, Vol. 4*, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, **2012**.
- [64] C. T. Okamoto, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 29, 215-228.
- [65] S. Mayor, R. E. Pagano, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, 8, 603-612.
- [66] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, 55, 1189-1193.
- [67] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vivès, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 559-577.
- [68] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 16010-16017.
- [69] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2005**, 102, 247-253.
- [70] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 585-590.
- [71] I. A. Ignatovich, E. B. Dizhe, A. V. Pavlotskaya, B. N. Akifiev, S. V. Burov, S. V. Orlov, A. P. Perevozchikov, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 42625-42636.
- [72] Raheleh Rahbari, Tom Sheahan, Vasileios Modes, Pam Collier, C. Macfarlane, a. R. M. Badge, *Biotechniques* **2009**, Vol. 46, No. 4, 277-284.
- [73] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed., Academic press, **2008**.
- [74] <http://de.lumiprobe.com/protocols/protein-maleimide-labeling>.
- [75] <http://de.lumiprobe.com/p/cy5-alkyne>.
- [76] h. w. l. c. p. n.-e.-l. Lumiprobe Life science solutions GmbH.
- [77] T. Lindl, G. Gstraunthaler, *Zell- und Gewebekultur - Von den Grundlagen zur Laborbank*, Springer Verlag, **2008**.
- [78] S. Letschert, Master thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2013**.
- [79] T. Klein, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2014**.
- [80] S. van de Linde, A. Loschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nature protocols* **2011**, 6, 991-1009.
- [81] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 18, 301-313.
- [82] L. D. Unsworth, H. Sheardown, J. L. Brash, *Langmuir* **2008**, 24, 1924-1929.
- [83] J. Ashby, S. Schachermeyer, S. Pan, W. Zhong, *Analytical chemistry* **2013**, 85, 7494-7501.
- [84] T. Peters Jr, A. J. Stewart, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2013**, 1830, 5351-5353.



- [85] P. C. Jocelyn, *European Journal of Biochemistry* **1967**, *2*, 327-331.
- [86] J. Leluk, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Wroclaw, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/pp97/assignments/projects/leluk/project.htm>, **1997**.
- [87] J. S. Wall, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1971**, *19*, 619-625.
- [88] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 11613-11618.
- [89] B. D. Chithrani, W. C. Chan, *Nano letters* **2007**, *7*, 1542-1550.
- [90] V. P. Shastri, G. Altankov, A. Lendlein, *Advances in Regenerative Medicine: Role of Nanotechnology, and Engineering Principles*, Springer Netherlands, **2010**.
- [91] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288-6308.
- [92] S. Singh, I. Zilkowski, A. Ewald, T. Maurell-Lopez, K. Albrecht, M. Moller, J. Groll, *Macromol Biosci* **2013**, *13*, 470-482.
- [93] <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp00003.pdf>.
- [94] <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/the-alexa-fluor-dye-series.html>.
- [95] <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/alexa-fluor-dyes-spanning-the-visible-and-infrared-spectrum.html?icid=fr-alexa-3#head8>.
- [96] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [97] <http://de.spectrumlabs.com/lit/en.SP17.pdf>.
- [98] J. Wagner, *Chemie Ingenieur Technik* **1986**, *58*, 578-583.
- [99] J. Groll, J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H. A. Klok, R. E. Brenner, M. Moeller, *Journal of biomedical materials research Part A* **2005**, *74*, 607-617.
- [100] S. H. D. P. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas, *ACS Nano* **2009**, *4*, 365-379.
- [101] S. Singh, Dissertation thesis, RWTH Aachen **2013**.

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanogel-Systeme ..... Seite 3
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der NP-Synthese in inverser Miniemulsion; verändert nach Figure 2.4 aus der Dissertation von S. Singh <sup>[1]</sup> ... Seite 14
- Abbildung 3:** Übersicht der Stimuli, die zu einer Strukturveränderung der NP und der damit verbundenen Freisetzung des Wirkstoffes führen können; verändert nach Priya James Honey et al., 2014, Figure 1 <sup>[28]</sup> .....Seite 17
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung des NTA-Aufbaus, verändert nach Dragovic et al., 2011, Figure 1. Abgebildet mit Erlaubnis. <sup>[34]</sup> Copyright 2011, Elsevier Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine ..... Seite 23
- Abbildung 5:** Humanes Serumalbumin (HSA) – Darstellung der Sekundärstruktur nach Sugio et al. (1999) <sup>[46]</sup> aus der RCSB Protein Data Base [www.pdb.org](http://www.pdb.org), Identifikationscode PDB ID 1AO6 ..... Seite 29
- Abbildung 6:** Verschiedene Formen der Endozytose am Beispiel einer Säugerzelle. Die Art und Weise, wie das Material aufgenommen wird, ist abhängig von der Größe des endozytotischen Vesikels, der Natur des aufzunehmenden Materials und dem Mechanismus der Vesikelbildung; verändert nach Conner und Schmid, 2003, Figure 1. Abgebildet mit Erlaubnis. <sup>[54]</sup> Copyright 2003, Nature Publishing Group, Nature ..... Seite 32
- Abbildung 7:** Strukturformeln von esterhaltigem (1) und esterfreiem (2) PG-SH ..... Seite 40
- Abbildung 8:** UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie einer Cy7-Maleimid-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen – mittleres Extinktionsspektrum bestimmt aus 4 Messungen..... Seite 67
- Abbildung 9:** Kalibriergerade zur Bestimmung der in einer PG<sub>EF</sub>-SH-Cy7-Lösung befindlichen Cy7-Maleimid-Konzentration – basierend auf der Extinktion des Farbstoffes Cy7-Maleimid am Anregungsmaximum (Geradengleichung:  $y = 0,16454 x$ ) .....Seite 67
- Abbildung 10:** Extinktionsspektren der Reaktionsprodukte aus den 2 Ansätzen zur Funktionalisierung von PG<sub>EF</sub>-SH .....Seite 68
- Abbildung 11:** Kalibriergerade zur Bestimmung der im Dialysewasser / der in einer PG<sub>EF</sub>-SH-Cy5-Lösung befindlichen Cy5-Alkin-Konzentration – basierend auf der Extinktion des Farbstoffes Cy5-Alkin am Anregungsmaximum (Geradengleichung:  $y = 0,26738 x$ ) ..... Seite 71

- Abbildung 12:** Extinktionsspektrum (original und korrigiert) des Reaktionsproduktes des Ansatzes  $\text{PG}_{\text{EF}}\text{-SH-Cy5-1}$  (0,25 mg gelöst in 1 ml Wasser) und vergleichende Messungen .....Seite 73
- Abbildung 13:** Übersicht über die während der Versuchsphase synthetisierten NG .....Seite 75
- Abbildung 14:** DLS-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven NG .....Seite 77
- Abbildung 15:** DLS-Partikelcharakterisierung der über Michael-Addition hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 79
- Abbildung 16:** DLS-Partikelcharakterisierung der via UV-Click-Reaktion hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 80
- Abbildung 17:** DLS-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NG-Lösungen .....Seite 82
- Abbildung 18:** DLS-Partikelcharakterisierung der nicht Stimuli-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP-Lösung  $\text{NGCy7\_MA\_1}$  .....Seite 83
- Abbildung 19:** NTA-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, nicht markierten NP .....Seite 86
- Abbildung 20:** NTA-Partikelcharakterisierung der über eine Michael-Addition hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 88
- Abbildung 21:** NTA-Partikelcharakterisierung der durch UV-Click-Reaktion hergestellten, nicht mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 90
- Abbildung 22:** NTA-Partikelcharakterisierung der redox-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 92
- Abbildung 23:** NTA-Partikelcharakterisierung der nicht Stimuli-sensitiven, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten NP .....Seite 94
- Abbildung 24:** Größenverteilung der redox-sensitiven NP ( $\text{NG\_3}$ ) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C .....Seite 96
- Abbildung 25:** Größenverteilung der nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP ( $\text{NG\_MA\_1}$ ) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C .....Seite 98
- Abbildung 26:** Partikelkonzentration der redox-sensitiven NP ( $\text{NG\_3}$ ) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C .....Seite 100
- Abbildung 27:** Partikelkonzentration der nicht Stimuli-sensitiven, über eine Michael-Addition hergestellten NP ( $\text{NG\_MA\_1}$ ) in DMEM nach Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C .....Seite 102

- Abbildung 28:** UV/Vis-Spektroskopie der NG-Überstände nach dem Zentrifugieren (15 Minuten, 14000 rpm). Alle Proben wurden gegen reine NP-Lösung gemessen .....Seite 104
- Abbildung 29:** Kalibriergerade (Geradengleichung  $y = 0,00453 x$ ) zur Bestimmung der im Proben-Überstand vorhandenen BSA-Konzentration – basierend auf der Extinktion des an BSA gebundenen Fluorophors Cy5-NHS-Ester am Anregungsmaximum. Als Baseline für die Messungen zur Erstellung der Kalibriergeraden diente 0,01 molarer PBS-Puffer. ....Seite 106
- Abbildung 30: Links:** HeLa-Zellen nach 1 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), fluoreszierende NP in Vesikeln am Rand der Zelle lokalisiert; **Rechts:** HeLa-Zellen nach 2 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), fluoreszierende NP in Vesikeln an bestimmten Ecken der Zelle lokalisiert, langsame Wanderung der fluoreszierenden Vesikel in Richtung Zellinneres hat eingesetzt. ....Seite 109
- Abbildung 31:** HeLa-Zellen nach 4 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2), Wanderung der fluoreszierenden Vesikel in Richtung Zellinneres .....Seite 110
- Abbildung 32:** HeLa-Zellen nach 8 h Inkubation mit NP (NG680\_TAT\_2); fluoreszierende, NP enthaltende Vesikel im Zellinneren lokalisiert, scheinbar keine Aufnahme der Vesikel in den Zellkern; keine Öffnung und Entleerung der Vesikel erkennbar .....Seite 110
- Abbildung 33: Links:** HeLa-Zellen nach 1,45 h Inkubation mit NP (NG680\_4), starkes Hintergrundleuchten durch Aggregatbildung, fluoreszierende NP frei in Lösung; fluoreszierende, mit NP beladene Vesikel im Zellinneren nicht klar erkennbar; **Rechts:** HeLa-Zellen nach 4 h Inkubation mit NP (NG680\_4), fluoreszierende NP frei in Lösung; fluoreszierende Endozytose-Vesikel innerhalb der Zelle nicht klar erkennbar .....Seite 112
- Abbildung 34:** Vereinfachte Strukturformeln von Polyethylenglycol (PEG) und Polyglycidol (PG) .....Seite 113
- Abbildung 35:** Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von  $PG_{EH-SH}$  mit Alexa Fluor 680-Maleimid über die Michael-Addition .....Seite 116
- Abbildung 36:** a) Strukturformel von Cy7-Maleimid, b) Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von  $PG_{EF-SH}$  mit Cy7-Maleimid über die Michael-Addition .....Seite 118
- Abbildung 37:** a) Strukturformel von Cy5-Alkin, b) Reaktionsgleichung der Funktionalisierung von  $PG_{EF-SH}$  mit Cy5-Alkin über die UV-Click-Reaktion .....Seite 123
- Abbildung 38:** a) NP-Synthese via Oxidation, b) NP-Synthese via Michael-Addition .....Seite 128

- Abbildung 39:** Reaktionsschema der Synthese redox-sensitiver „Standard“-NP; Oxidation der Thiol-Funktionen zu Disulfidbrücken unter Verwendung von Alloxan als Oxidationsmittel .....Seite 129
- Abbildung 40:** Reaktionsschema für die Synthese nicht reaktiv degradierbarer NP via Michael-Addition .....Seite 130
- Abbildung 41:** Größenverteilung einer nicht fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersion (NG\_3): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS .....Seite 132
- Abbildung 42:** Größenverteilung einer fluoreszenzmarkierten, redox-sensitiven NP-Dispersion (NG680\_TAT\_2): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS .....Seite 134
- Abbildung 43:** Größenverteilung einer nicht fluoreszenzmarkierten, nicht Stimuli-sensitiven, via Michael-Addition hergestellten NP-Lösung (NG\_MA\_2): a) Charakterisierung mittels NTA; b) Charakterisierung mittels DLS .....Seite 135

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll erstellt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich während dieser Zeit begleitet und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Groll, der mir dieses wirklich spannende Dissertationsthema zur Bearbeitung überlassen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, mich näher mit der interessanten Thematik der Nanopartikel-Forschung und deren Einsatzmöglichkeiten zu beschäftigen. Vielen Dank für die herzliche und professionelle Betreuung sowie die Mühe, die Sie in die Arbeit investiert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt M. Sc. Ilona Zilkowski für ihr Engagement in der Betreuung, ihre Unterstützung und ihre konstruktive Kritik, die mir in großem Maße zur Erstellung einer durchdachten und strukturierten Arbeit verhalf.

Ein weiterer ganz besonderer Dank geht an Dr. Krystyna Albrecht. Auch ihre zahlreichen, konstruktiven Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch PD Dr. Sören Doose und M. Sc. Sebastian Letschert vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik des Biozentrums der Universität Würzburg sowie deren Mitarbeitern für die Kultivierung der HeLa-Zelllinie und die Durchführung der *Live-Cell*-Mikroskopie.

Danken möchte ich auch Laura, Simone und Susanne, mit denen ich während der experimentellen Phase dieser Arbeit zahlreiche lustige und unvergessliche Momente erleben durfte.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund einen großen Dank aussprechen. Meinen Eltern, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, auf die ich immer zählen konnte und die mich während des Studiums und der Zeit der Promotion, aber auch darüber hinaus immer unterstützt haben. Meinem Freund für seine Unterstützung und Geduld.

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Name: Theresa Leonora Zipplies  
Geburtsdatum: 27.09.1987  
Geburtsort: Heidelberg  
Adresse:  
Familienstand: ledig

### *Beruflicher Werdegang*

---

09/2013 – 12/2013      Vorbereitungsassistentin, Zahnarztpraxis am Kurpark, Inhaber: Dr. Jan-Hendrik Bartel, Bad Dürkheim

01/2014 – 10/2015      Vorbereitungsassistentin, Zahnärztliche Gemeinschafts-praxis Dr. Jan-Hendrik Bartel und ZÄ Maren Sattler, Bad Dürkheim

seit 10/2015              Angestellte Zahnärztin, Zahnärztliche Gemeinschafts-praxis Dr. Jan-Hendrik Bartel und ZÄ Maren Sattler, Bad Dürkheim

### *Fort- und Weiterbildung*

---

02/2014                      Oralchirurgie für Zahnärztinnen, Akademie für Zahnärztliche Fortbildung Karlsruhe, Referentin: Prof. Dr. Margit-Ann Geibel, Ulm

10/2016                      Geistlich Workshop-Day – Die jungen Chirurgen, Geistlich Biomaterials, Baden-Baden, Referenten: Dr. Stefan Schnitzer, Dr. Dr. Nils Weyer, PD Dr. Dr. Marcus O. Klein, Dr. Roman Beniashvili



02/2016 – 02/2017 Curriculum Kieferorthopädie, Akademie für Zahnärztliche Fortbildung Karlsruhe, Referent: PD Dr. Martin Sander, Frankfurt

### ***Hochschulausbildung***

---

10/2007 - 11/2012 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

22.03.2010 Physikum, Gesamtnote „sehr gut“

15.11.2012 Staatsexamen, Gesamtnote „gut“

### ***Schulbildung***

---

1998 - 2007: Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt an der Weinstraße, Abschluss: Abitur im März 2007; Note 2,0

2004: Colegio de Educación Polimodal No. 11, Lino Torres in Resistencia, Chaco, Argentinien

1994 - 1998: Grund- und Hauptschule Dr.Albert-Finck-Schule in Neustadt/Weinstraße-Hambach

### ***Praktische Erfahrungen***

---

05/2013 - 07/2013 Tutorin im klinischen Phantomkurs für Parodontologie an der Zahnklinik der Universität Würzburg

02/2012 - 03/2012 Zahnärztliche Famulatur an der “Fiji School of Medicine”, Department of Oral Health, Suva, Fiji Islands

05/2007 - 07/2007 Praktikum in der Zahnmedizinischen Abteilung, Hospital Pablo Arturo Suárez, Quito, Ecuador

***Besondere Kenntnisse***

---

Sprachen

Englisch und Spanisch in Wort und Schrift,  
Grundkenntnisse in Französisch

Neustadt an der Weinstraße, 07.06.2017