

# Nanokristalle zur Visualisierung des Lipoproteinstoffwechsels

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Oliver Thomas Bruns**  
aus Hamburg

Hamburg  
Juni 2009

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Dezember 2005 bis April 2009 gefördert durch ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes im Institut für Molekulare Zellbiologie an dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf sowie dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg in den Gruppen von Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und Prof. Dr. Horst Weller durchgeführt. Weiterhin bestand im Rahmen dieser Arbeit eine enge Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie / Elektrochemie von Prof. Dr. Alexander Eychmüller an der Technischen Universität Dresden, der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie von Prof. Dr. Gerhard Adam an dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf sowie der Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie und Mikrotechnologie von Dr. Heinrich Hohenberg am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg.

Die vorliegende kumulative Dissertation fasst Arbeiten aus folgenden drei Publikationen und zwei Manuskripten zusammen:

Boldt,K., **Bruns,O.T.**, Gaponik,N., & Eychmuller,A. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 1959-1963 (2006).

Tromsdorf,U.I., Bigall,N.C., Kaul,M.G., **Bruns,O.T.**, Nikolic,M.S., Mollwitz,B., Sperling,R.A., Reimer,R., Hohenberg,H., Parak,W.J., Forster,S., Beisiegel,U., Adam,G., & Weller,H. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano Letters* **7**, 2422-2427 (2007).

**Bruns,O.T.**, Ittrich,H., Peldschus,K., Kaul,M.G., Tromsdorf,U.I., Lauterwasser,J., Nikolic,M.S., Mollwitz,B., Merkel,M., Bigall,N.C., Sapra,S., Reimer,R., Hohenberg,H., Weller,H., Eychmuller,A., Adam,G., Beisiegel,U., & Heeren,J. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nature Nanotechnology*. **4**, 193-201 (2009).

**Bruns,O.T.**, Beisiegel,U. & Heeren,J. Nanosomes: A new tool to non-invasively study postprandial lipoprotein metabolism in vivo, *in Vorbereitung*

Tromsdorf,U.I., **Bruns,O.T.**, Salmen,S., Beisiegel,U., & Weller,H. Towards the development of a T1 MR contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles, *in Vorbereitung*

Diese Manuskripte befinden sich im Anhang.

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

2. Gutachterin: Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel

Disputation: 8.7.2009

*Für Julia und meine Eltern*

## Zusammenfassung

Die vorliegende kumulative Dissertation fasst drei Publikationen und zwei Manuskripte zusammen, welche aus dieser Promotionsarbeit hervorgegangen sind. Die Zielsetzung dieses Promotionsprojektes war es Lipoproteine, im speziellen die postprandialen Chylomikronen und deren „Remnants“, mit Nanokristallen zu markieren, um auf diese Weise den Stoffwechsel der Lipoproteine in zellulären Systemen und Tiermodellen zu visualisieren. Hierbei sollten Halbleiter- und Eisenoxid-Nanokristalle verwendet werden, da sich diese hervorragend zur Darstellung mittels der Elektronen- und Fluoreszenz-Mikroskopie sowie der Magnet-Resonanz-Tomographie eignen.

Es wurden zwei Markierungsstrategien verfolgt, zum einem mit hydrophilen und zum anderen mit lipophilen Nanokristallen. Hierbei hat es sich als Problem herausgestellt die kolloidale Stabilität der wasserlöslichen Nanokristalle in physiologischen Puffersystemen zu erhalten. Es wurde eine Aggregation der Teilchen beobachtet, die eine starke Veränderung der physikalischen Eigenschaften verursacht hat. Erstmals wurde hierzu eine systematische Untersuchung mit wasserlöslichen Halbleiter-Nanokristallen durchgeführt<sup>1</sup>. Darauf aufbauend wurde eine Funktionalisierung von Eisenoxid-Nanokristallen mit Polyethylenglykol-Ketten verschiedener Länge durchgeführt. Die Kettenlänge wurde in Hinblick auf eine erhöhte Stabilität gegenüber der Aggregation im Serum optimiert (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung, siehe Anhang).

Um den Lipidkern von Lipoproteinen mit lipophilen Nanokristallen zu markieren, wurde ein rekombinantes Modellsystem aus physiologischen humanen Lipiden und Apolipoproteinen etabliert. Da die so hergestellten Mizellen lipophile Nanokristalle im Lipidkern enthalten, wurde hierfür der Begriff „Nanosomen“ eingeführt. Für die Markierung von Lipoproteinen mit Eisenoxid-Nanokristallen zur Darstellung mittels Magnet-Resonanz-Tomographie, ist deren quantitativer Einfluss auf das gemessene Signal, ihre Relaxivität, von großer Bedeutung. In einer vergleichenden Studie wurde der Einfluss von Nanokristallgröße und insbesondere verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen erstmals untersucht und an Hand theoretischer Modelle diskutiert<sup>2</sup>. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Nanosomen analog zu nativen Lipoproteinen prozessiert werden und somit ein geeignetes System zum Studium des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels sind (Bruns et al., Manuskript in Vorbereitung, siehe Anhang). Mit Hilfe der Nanosomen konnte zum ersten Mal der postprandiale Lipoproteinstoffwechsel in Echtzeit mittels der Magnet-Resonanz-Tomographie im Tiermodell visualisiert und quantifiziert werden<sup>3</sup>.

## Summary

This cumulative dissertation comprises three publications and two manuscripts in preparation. The goal of this thesis was to label lipoproteins, in particular postprandial chylomicrons and its remnants with nanocrystals to visualise their metabolism in cellular systems and animal models. Due to their excellent suitability for electron microscopy as well as fluorescence and magnetic-resonance-imaging, semiconductor and iron oxide nanocrystals were applied.

Two labelling strategies were pursued. Both hydrophilic and lipophilic nanocrystals were used. The challenge was to preserve the colloidal stability of hydrophilic nanocrystals in physiological buffers, as an aggregation of the particles was observed, causing a strong alteration of their physical properties. For the first time a systematic analysis with water soluble semiconductor nanocrystals was conducted<sup>1</sup>. Based on these results, iron oxide nanocrystals were functionalised with polyethylenglycol-chains of different lengths. The chain length was optimised with regard to its resistance against aggregation in serum (Tromsdorf et al., manuscript in preparation, see supplement).

To label the lipid core of lipoproteins with lipophilic nanocrystals a recombinant model system consisting of physiological human lipids and apolipoproteins was established. Since the micelles contained lipophilic nanocrystals in the lipid core, it was designated 'nanosomes'. For magnetic-resonance-imaging of lipoproteins labelled with iron oxide nanocrystals, their quantitative influence on the signal, its relaxivity, is of great importance. The influence of nanocrystal size and surface functionalisation were compared and discussed on the basis of theoretical models<sup>2</sup>. Additionally, it was demonstrated that nanosomes are processed in analogy to native lipoproteins. Therefore, nanosomes are an appropriate tool to study postprandial lipoprotein metabolism (Bruns et al., manuscript in preparation, see supplement). Nanosomes allowed to visualise and quantify the postprandial lipoprotein metabolism in real-time by magnetic-resonance-imaging *in vivo* for the first time<sup>3</sup>.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>IV</b>
<b>Summary</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>Synthese und Eigenschaften von Nanokristallen</b>	<b>3</b>
Synthese von Nanokristallen	3
Eigenschaften von Halbleiter-Nanokristallen	4
Eigenschaften von Eisenoxid-Nanokristallen	6
<b>Anwendungen von Nanokristallen in der Biomedizin</b>	<b>8</b>
Prinzip der Magnet-Resonanz-Tomographie	8
Kontrastmittel und Relaxivität	9
Bisherige Anwendungen von Nanokristallen in der Biomedizin	12
<b>Lipoproteinstoffwechsel</b>	<b>15</b>
<b>Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel</b>	<b>19</b>
Intestinale Lipidresorption	19
Chylomikronen Synthese und Sezernierung	19
Prozessierung	20
Aufnahme	21
Degradation und Recycling	22
Kinetik	22
<b>Markierung von Lipoproteinen mit Nanokristallen</b>	<b>24</b>
<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>26</b>
Charakterisierung der physikalischen und chemischen Eigenschaften	26
Halbleiter-Nanokristalle aus wässrigen Synthesen	27
Superparamagnetische Nanokristalle aus organometallischen Hochtemperatursynthesen	29
Charakterisierung der Relaxivitäten von verschiedenen funktionalisierten SPIO-Nanokristallen	31
Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels	36
<b>Ausblick</b>	<b>43</b>
<b>Literatur</b>	<b>44</b>
<b>Anhang</b>	
<b>Publikationen</b>	
Journal of Physical Chemistry B 2006	i
Nano Letters 2007	xvi
Nature Nanotechnology 2009	xv
<b>Manuskripte</b>	
Nanosomes: A new tool to non-invasively study postprandial lipoprotein metabolism in vivo	lxxvi
Towards the development of a T1 MR contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles	lxxx
<b>Film zur Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels mit dynamischer MRT-Bildgebung</b>	<b>xcvi</b>
<b>Danksagung</b>	<b>xcvii</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>xcviii</b>
<b>Erklärung</b>	<b>cii</b>
<b>Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge</b>	<b>ciii</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
Apo	Apolipoprotein
Cd	Cadmium
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
ELR	Echo-Limiting-Regime
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1
H	Wasserstoff
HDL	High-Density Lipoprotein
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HL	Hepatische Lipase
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL-Rezeptor	Low-Density Lipoprotein-Rezeptor
LpL	Lipoproteinlipase
LRP1	Low-Density Lipoprotein-Rezeptor-related Protein 1
MAR	Motional-Avering-Regime
MPA	Mercapto-Propionsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEG	Polyethylenglykol
PEG-PEI	Polyethylenglykol-Polyethylenimin
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
QD	Quantum Dots
RES	Retikulo-Endotheliales-System
S	Schwefel
SDR	Static-Dephasing-Regime
Se	Selen
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxid
Te	Tellur
TGA	Thioglykolsäure
TRL	Triglyzerid-reiche Lipoproteine
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
Zn	Zink

## Einleitung

Nanotechnologie befasst sich mit der Erforschung, Bearbeitung und Produktion von Gegenständen und Strukturen die kleiner als 100 Nanometer sind.

Diese Gegenstände und Strukturen, welche Nanoteilchen genannt werden, werden heute aus den verschiedensten Materialien hergestellt. Hierzu gehören neben organischen vor allem anorganische Verbindungen wie Edelmetalle, Halbleiter und ferrimagnetische Oxide, die auf Grund ihres kristallinen Kerns als Nanokristalle bezeichnet werden. Durch geeignete Oberflächenstabilisierung in der Synthese, die aus der Nukleation von Kristallisationskeimen und dem folgenden Kristallwachstum besteht, lassen sich Strukturen in der Größe von einigen Nanometern aus diesen Materialien gezielt herstellen<sup>4,5</sup>. Diese Teilchen besitzen bei der Wahl der richtigen Stabilisatoren die Fähigkeit als Kolloide optisch klare Dispersionen zu bilden.

Die möglichen Anwendungen in der Biomedizin reichen von der stabilen Fluoreszenzmarkierung für die Lebendzell-Mikroskopie<sup>6-14</sup> über die intravital Mikroskopie mit im Bereich des nahen Infrarot emittierenden Nanokristallen<sup>15-27</sup> bis hin zur *in vivo* Bildgebung mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanokristallen<sup>28-38</sup>. Erste Anwendungen sind bereits experimentell verwirklicht, Nanokristalle gehören zum heutigen Zeitpunkt aber noch nicht zu den alltäglichen Werkzeugen in der Biomedizin<sup>39-41</sup>.

Erworbene und vererbte Störungen im Lipoproteinstoffwechsel, welcher den Transport der Lipide im Blut vermittelt, spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose<sup>42</sup>. Die Folge sind kardiovaskuläre Erkrankungen, welche weltweit die häufigste Todesursache darstellen<sup>43,44</sup>. Neben den High-Density Lipoprotein(HDL)- und Low-Density Lipoprotein(LDL)-Konzentrationen im Blut, welche als Risikofaktoren lange etabliert sind, konnte inzwischen gezeigt werden, dass triglyzerid-reiche Lipoproteine einen unabhängigen Risikofaktor darstellen<sup>45-47</sup>. Daher sollten im Rahmen dieses Promotionsprojektes Lipoproteine mit Hilfe von Nanokristallen visualisiert werden.

Es sollten im speziellen die postprandialen Chylomikronen und deren „Remnants“, die Nahrungsfette vom Darm zur Leber und anderen Organen transportieren, markiert werden, um ihren Stoffwechsel in zellulären Systemen und Tiermodellen besser untersuchen zu können. Hierbei sollten Halbleiter- und Eisenoxid-Nanokristalle verwendet werden, die sich hervorragend zur Darstellung mittels der Elektronen- und Fluoreszenz-Mikroskopie sowie der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) eignen. Mit dieser Markierung sollte der Stoffwechsel der Lipoproteine erstmals nicht-invasiv, also ohne operativen Eingriff, im lebenden Organismus visualisiert werden.



## *Synthese und Eigenschaften von Nanokristallen*

In dieser Arbeit werden Nanokristalle bestehend aus ferrimagnetischen Oxiden und Halbleitermaterialien verwendet. In ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden sie sich wegen ihres sehr großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses stark von dem Verhalten des ausgedehnten Festkörpers. Der Grund hierfür sind quantenmechanische und magnetische Effekte, die bei Kristallen in der Größe von wenigen Nanometern auftreten<sup>48,49</sup>. Auf die Synthese und Eigenschaften von Nanokristallen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

### Synthese von Nanokristallen

Nanokristalle lassen sich auf verschiedenen Wegen synthetisieren. Allgemein können vier Kategorien unterschieden werden: Die Ko-Präzipitation in wässrigen Lösungen, die thermale Dekomposition von organometallischen Vorläuferverbindungen in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln, die Synthese in Mikroemulsionen und die Synthese unter hydrothermalen Bedingungen<sup>50</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanokristalle verwendet, welche auf den beiden erstgenannten Wegen synthetisiert wurden. Auf diese wird im Folgenden eingegangen.

Aufgrund ihrer direkten Wasserlöslichkeit und ihres geringen hydrodynamischen Durchmessers wurden in dieser Arbeit Halbleiter-Nanokristalle verwendet, welche durch die Ko-Präzipitation in wässrigen Lösungen hergestellt wurden. Bei dieser Art der Synthese wird ein Zink- oder Cadmiumsalz, beispielsweise als Perchlorat, in wässriger Lösung vorgelegt und dann das Chalkogen (Schwefel, Selen oder Tellur), beispielsweise in Form von der Chalkogenwasserstoffsäure ( $H_2S$ ,  $H_2Se$  oder  $H_2Te$ ), zugeführt. Auf Grund der sehr geringen Löslichkeitsprodukte der Cadmiumchalkogenide kommt es zur Nukleation. Mit Hilfe von sogenannten Stabilisatoren, zumeist wasserlösliche Thiolverbindungen, welche mit einer hohen Affinität an die Oberfläche dieser Verbindungen binden, wird das anschließende Wachstum der Kristalle im Bereich von wenigen Nanometern aufgehalten und kontrolliert. Durch Wahl geeigneter Synthesebedingungen (Temperatur, Zeit und Konzentration) und nachfolgender Aufarbeitung mittels Größenselektiver-Fällung der Kolloide lassen sich so monodisperse Nanokristallpräparationen mit einer sehr guten Quantenausbeute und einem engen Emissionsspektrum herstellen. Allerdings ist die Ausbeute auf Grund der nötigen Aufreinigungsschritte gering. Die so gewonnenen Nanokristalle sind wasserlöslich<sup>51-59</sup>.

Sowohl für Eisenoxid als auch für Halbleiter-Nanokristalle konnten in den vergangenen Jahren Syntheseprotokolle in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln etabliert werden. Im Vergleich zu den wasserbasierten Synthesen werden die Nukleation und das Kristallwachstum

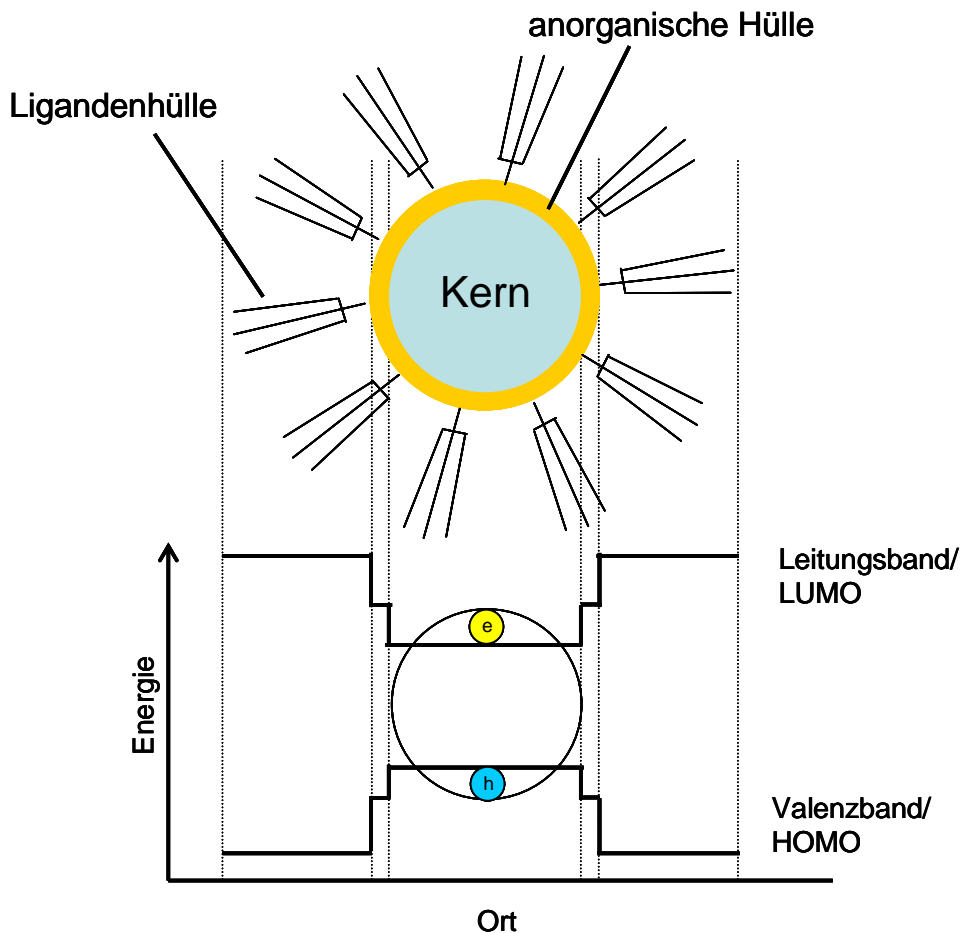
bei diesen Synthesen bei deutlich höheren Temperaturen durchgeführt. Das Reaktionsprinzip beruht hierbei auf der pyrolytischen Dekomposition von organometallischen Verbindungen, welche das Metallion oder das Chalkogen-Ion tragen. Auch hierbei werden oberflächenaktive Stabilisatoren eingesetzt, welche das Kristallwachstum im Bereich von wenigen Nanometern aufhalten. Über die Reaktionsbedingungen kann die Größe der Nanokristalle gesteuert werden<sup>4,60-70</sup>.

Generell werden die Synthese-Strategien in „Heating-Up“-Synthesen und „Hot-Injection“-Methoden unterteilt, wobei Halbleiter-Nanokristalle zumeist mittels der Hot-Injektion-Methode synthetisiert werden und lediglich für die Eisenoxid-Nanokristalle beide Verfahren eine breite Verwendung finden<sup>50,61,62</sup>. Die so synthetisierten Nanokristalle sind nur in unpolaren Lösungsmitteln löslich.

Die Qualität der in hochsiedenden Lösungen hergestellten Nanokristalle, also eine enge Größenverteilung, eine sehr gute Kristallinität und eine hohe Quantenausbeute, ist im Allgemeinen besser als die Qualität der Nanokristalle aus wasserbasierten Synthesen. Durch den Wegfall der Größenselektiven-Fällung kann überdies eine höhere Ausbeute erzielt werden. Allerdings müssen die in hochsiedenden Lösungsmitteln hergestellten Nanokristalle nach der Synthese auf Grund ihrer Hydrophobizität für die meisten biologischen Anwendungen noch einem Phasentransfer unterzogen werden.

### Eigenschaften von Halbleiter-Nanokristallen

Diese Nanokristalle werden wegen ihrer quasi nulldimensionalen Ausdehnung und quantenmechanischen Eigenschaften auch als Quantenpunkte bezeichnet. Hierfür wurde aus dem englischen Sprachraum auch die Bezeichnungen Quantum Dots oder Qdots übernommen. In den letzten 25 Jahren sind die Halbleiter-Nanokristalle zunehmend in den Fokus der interdisziplinären Forschung gerückt<sup>40,48,49,57,71-85</sup>. Sie haben einen elektronischen Zustand im Übergang zwischen einem Molekül mit Orbitalen und einem Festkörper mit Bandstrukturen. Ihre optische Eigenschaften können durch Variation der Teilchengröße verändert werden<sup>71,79,83-85</sup>.



**Abbildung 1: Halbleiter-Nanokristalle**

Die Lokalisierung des Elektron-Loch-Paares im Kern des Teilchens wird durch eine anorganische Hülle und eine Schicht aus Stabilisatoren gewährleistet. (Abkürzungen: HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital, das höchste besetzte Orbital eines Moleküls; LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital, das niedrigste unbesetzte Orbital eines Moleküls; e - Elektron; h - Loch)

Durch Anregung eines Elektrons, beispielsweise durch Absorption eines Lichtquants, entsteht ein Elektron-Loch-Paar, dieses kann unter Lichtemission rekombinieren. Folglich besitzt das Material Fluoreszenzeigenschaften, wobei die Emissionswellenlänge von der Größe der Bandlücke abhängt (Abbildung 1). Wenn die Größe des Teilchens zunimmt, wird die Bandlücke kleiner. Grün emittierende Teilchen sind also kleiner als rot emittierende Teilchen. Die Grundlage hierfür ist der Größenquantisierungseffekt. Der energetische Betrag der Halbleiter-Bandlücke ist direkt von der Größe des Kristalls abhängig. Damit sind die optischen Eigenschaften der Halbleiter-Nanokristalle, wie ihr Absorptions- und Emissionsverhalten, über die Größe kontrollier- und einstellbar<sup>79,84,85</sup>. Je nach verwendetem Halbleitermaterial und seiner Bandlücke ist ein gewisser Spektralbereich zugänglich. Mit 2 bis 10 nm großen Teilchen kann unter Verwendung der geeigneten Materialien das Spektrum von 400 bis 1400 nm abgedeckt werden.

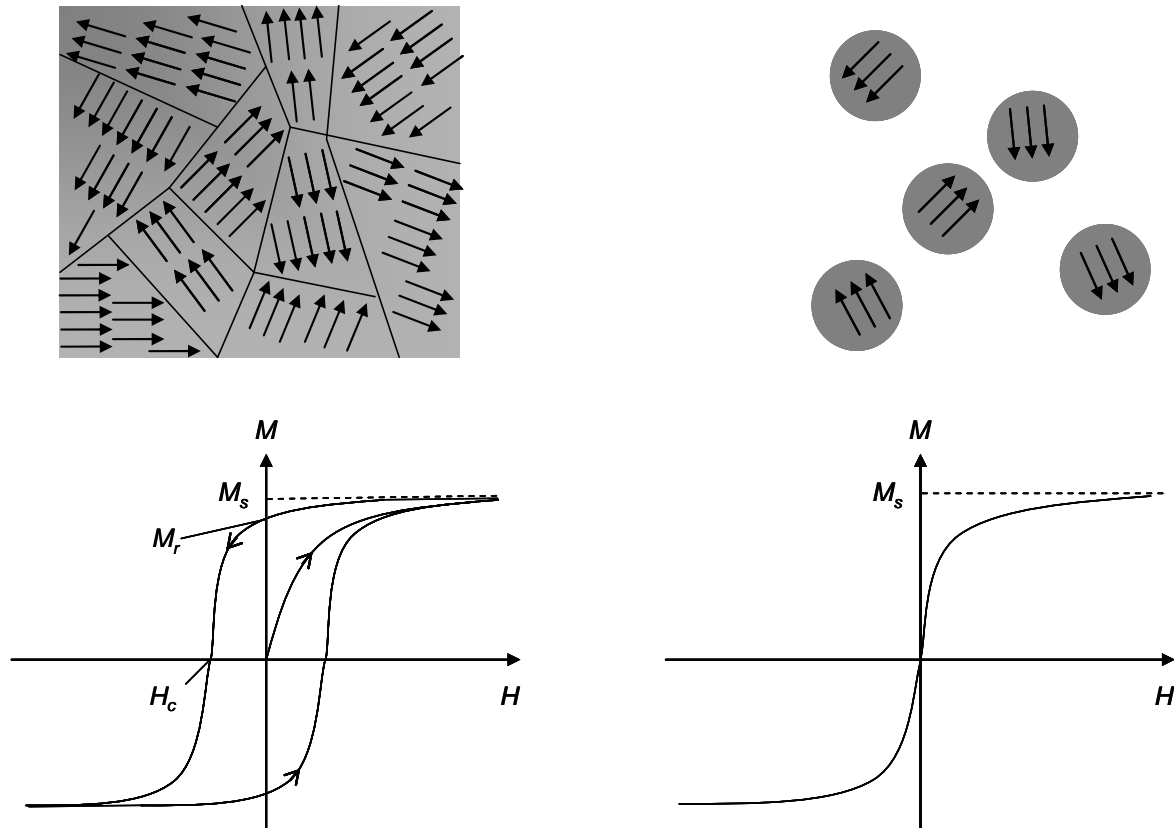
Einfache CdSe und CdTe-Nanokristalle zeigen häufig eine verringerte Quantenausbeute auf Grund von Fehlstellen im Kristallgitter an der Teilchenoberfläche, welche eine strahlungslose Rekombination der Ladungsträger ermöglicht. Dieses Verhalten tritt verstärkt auf, wenn hydrophobe Nanokristalle mittels Phasentransfer und Ligandenaustausch in ein wässriges Milieu transferiert werden oder wasserlösliche Nanokristalle in physiologischen Puffersystemen, wie sie in der Biomedizin genutzt werden, eingebracht werden<sup>86</sup>. Um die optischen Eigenschaften der Nanokristalle zu konservieren, sind Protokolle etabliert worden, die es ermöglichen, die Oberfläche mittels zusätzlicher Schalen zu schützen<sup>65,68</sup>. Hierbei finden sinnvollerweise Materialien mit einer größeren Halbleiterbandlücke eine Anwendung. Diese sogenannten „Core-Shell-Shell“- oder „Kern-Schale-Schale“-Nanokristalle sind heute der etablierte Standard für die Anwendung in der Biomedizin<sup>39,41,87</sup>.

Im Bereich der Biomedizin sind für potentielle Anwendungen die Unterschiede zu den bisher genutzten Farbstoffen interessant<sup>88</sup>. Konventionell werden für die Fluoreszenzmarkierung organische Farbstoffe eingesetzt, die auf Grund eines konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems eine Lumineszenz zeigen. Mit diesen wird die biologische Zielstruktur (Protein, DNA, Zucker oder Lipid) entweder kovalent verknüpft oder stabil assoziiert<sup>89</sup>. Die Unterschiede zwischen Halbleiter-Nanokristallen und organischen Farbstoffen zeigen sich, neben der um Größenordnungen höheren Photostabilität, der deutlich verlängerten Fluoreszenzlebensdauer und den sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten, vor allem in den Absorptions- und Emissionsspektren<sup>88,90</sup>. Die Emissionsspektren der Halbleiter-Nanokristalle sind Gauß-förmig und von deutlich geringerer spektraler Breite (20-30 nm) als die der organischen Farbstoffe. Die Absorptionsspektren sind sehr breit, sie zeigen ein charakteristisches erstes Maximum, welches bei einer ca. 30 nm kürzeren Wellenlänge als das Emissionsmaximum liegt. Die Absorption nimmt zum kürzerwelligen Bereich hin stark zu. Somit zeigen die Quantum Dots eine enge Emission und sind mit beliebigen kürzeren Wellenlängen anregbar. Damit sind Quantum Dots zumindest in Bezug auf ihre optischen Eigenschaften den konventionell eingesetzten organischen Farbstoffen gegenüber deutlich überlegen.

### Eigenschaften von Eisenoxid-Nanokristallen

Eine weitere Klasse von Nanokristallen mit Eigenschaften, die sich von denen des ausgedehnten Festkörpers unterscheiden, sind superparamagnetische Nanokristalle. Ferrimagnetische Materialien, wie beispielsweise Eisenoxide, sind nicht homogen magnetisiert, sondern aus kleinen Bereichen mit eigenen Magnetisierungsrichtungen aufgebaut, den sogenannten Weisschen Bezirken. Innerhalb eines Festkörpers sind die

Weisschen Bezirke energieminimiert ausgerichtet und die Gesamtmagnetisierung ist somit gleich Null (Abbildung 2). Die Weisschen Bezirke haben abhängig von dem verwendeten Material eine Ausdehnung in der Größenordnung von 50-100 Nanometern.



**Abbildung 2: Superparamagnetische Nanokristalle**

Ferrimagnetische Materialien sind aus kleinen Bereichen mit eigenen Magnetisierungsrichtungen aufgebaut, den sogenannten Weisschen Bezirken. Die Magnetisierungskurven des Materials zeigen eine Hysterese, das heißt nach Magnetisierung bis zur Sättigungsmagnetisierung ( $M_s$ ) verbleibt ohne äußeres Magnetfeld eine Restmagnetisierung, die Remanenz ( $M_r$ ). Erst beim Erreichen der Koerzitivitätsmagnetfeldstärke ( $H_c$ ) ist die Gesamtmagnetisierung Null. Synthetisiert man nun Nanokristalle, die ausreichend klein sind, kommt es innerhalb eines Teilchens nicht mehr zur Ausbildung von mehreren Weisschen Bezirken. Oberhalb der Blockierungstemperatur verhalten sich diese Teilchen superparamagnetisch. Es tritt keinerlei Hysterese-Verhalten mehr auf.

Synthetisiert man Nanokristalle, die ausreichend klein sind, kommt es innerhalb eines Kristalls nicht mehr zur Ausbildung von mehreren Weisschen Bezirken. Diese Kristalle bezeichnet man als Ein-Domänen-Teilchen. Innerhalb des Teilchens bleibt die ferromagnetische Ordnung bestehen und jedem Teilchen ist ein magnetisches Gesamtmoment zuzuordnen. Wenn nun die thermische Energie größer als die Anisotropie-Energie ist, was mit Erreichen der sogenannten Blockierungstemperatur der Fall ist, verhält sich der Nanokristall superparamagnetisch. In diesem Zustand ist der Nanokristall besonders gut magnetisierbar und es tritt keinerlei Hysterese-Verhalten auf (Abbildung 2)<sup>50</sup>.

Superparamagnetische Nanokristalle eignen sich auf Grund ihrer sehr hohen Magnetisierbarkeit besonders gut als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie<sup>28,35,37,38,61</sup>. Werden diese Kristalle gezielt an biologische Strukturen, wie Peptide, Antikörper, Proteine oder Lipoproteine gekoppelt, besteht die Möglichkeit zur nicht-invasiven, molekularen Ganzkörperbildgebung<sup>29-31,36,91</sup>.

### *Anwendungen von Nanokristallen in der Biomedizin*

Im Folgenden sollen einige mögliche Anwendungen von Nanokristallen im Bereich der Biomedizin dargestellt werden. Hierbei werden zu Beginn die Grundlagen der Magnet-Resonanz-Tomographie beschrieben, in der superparamagnetische Nanokristalle als Kontrastmittel eingesetzt werden, da diese für die Diskussion der weiter unten dargestellten Ergebnisse relevant sind.

### Prinzip der Magnet-Resonanz-Tomographie

Die Grundlage der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ist elektromagnetische Anregung von Atomkernen (meistens Wasserstoffkerne / Protonen) und anschließende Messung des Signals, welches von diesen bei der Rückkehr in die Ausgangslage (Relaxation) ausgesendet wird. Dieses physikalische Phänomen wird als Kernspinresonanz oder im Englischen als „Nuclear Magnetic Resonance“ (NMR) bezeichnet.

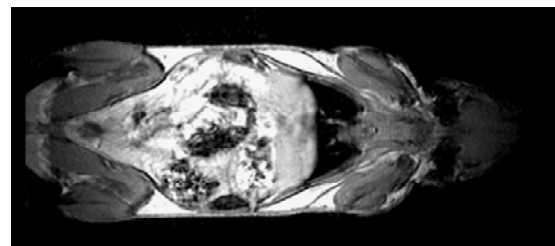
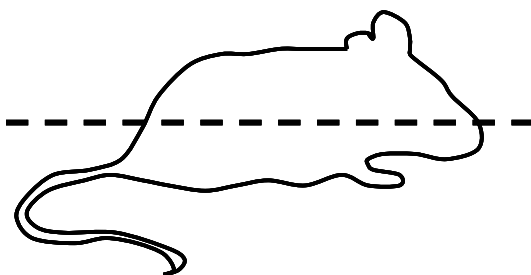
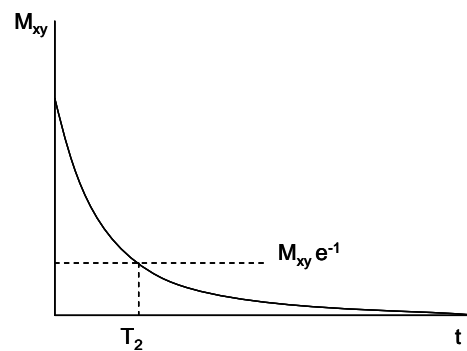
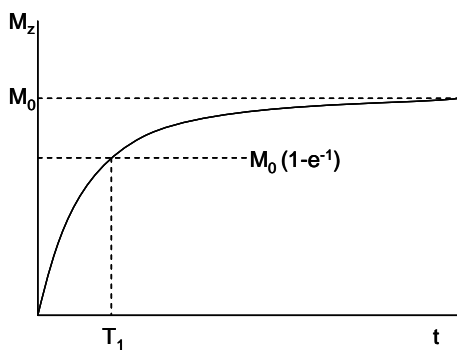
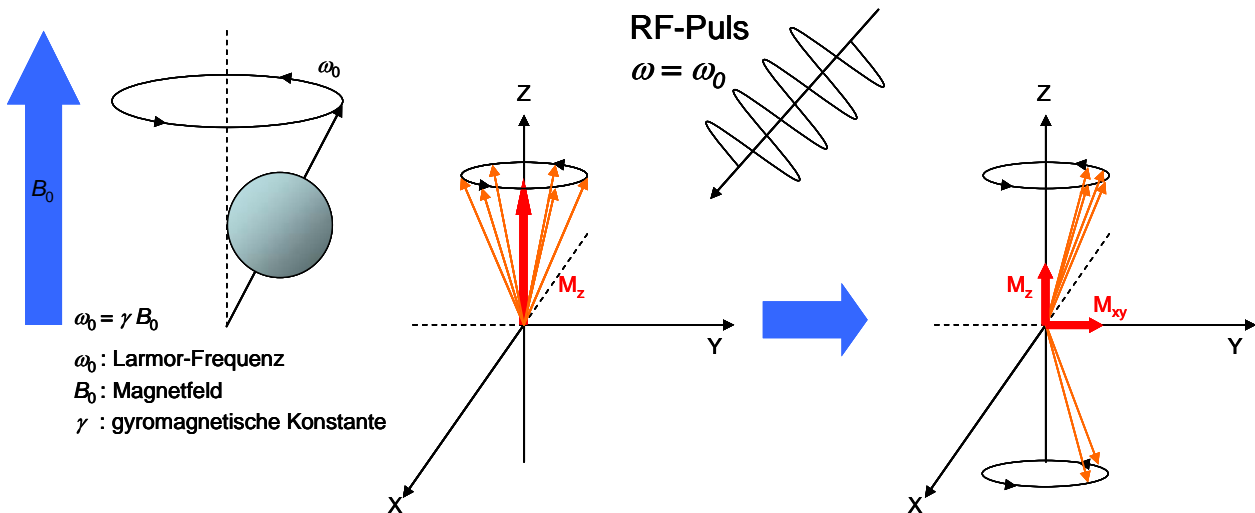
Kerne mit einem Eigendrehimpuls (Kernspin) richten sich in einem starken statischen Magnetfeld aus. Diese Ausrichtung resultiert in einer Nettomagnetisierung entlang des homogenen Magnetfeldes, die einer Präzessionsbewegung mit einer bestimmten Eigenfrequenz, der sogenannten Larmorfrequenz, entspricht. Durch einen Puls von Radiowellen der Larmorfrequenz, kann die Präzessionsbewegung in Richtung der zum Magnetfeld senkrechten Ebene (also transversal) ausgelenkt werden, wobei es zu einer Reduktion der Nettomagnetisierung entlang des Magnetfeldgradienten (also longitudinal) kommt. Gleichzeitig werden die Kernspins hierbei entlang der dem Magnetfeld senkrechten Ebene in Phase gebracht, was in einer transversalen Nettomagnetisierung resultiert. Nach dem Abschalten des Pulses existieren zwei unabhängige Relaxationsprozesse. Diese Prozesse können mit einer Spule, in der ein Strom induziert wird, gemessen werden. Die Rückkehr der Nettomagnetisierung in ihre Ausgangslage entlang des Magnetfeldes ist dabei die sogenannte longitudinale oder  $T_1$ -Relaxation. Dieser Prozess ist die Rückkehr der Spins in das thermische Gleichgewicht. Der durch die Boltzmann-Verteilung gegebene Besetzungsunterschied wird unter Abgabe von Energie an die Umgebung wieder hergestellt. Aus der Dephasierung der

Spins resultiert ein Verlust der transversalen Magnetisierung ohne Energieabgabe. Dies ist die sogenannte Spin-Spin-Relaxation (Abbildung 3). Hierbei gibt es zwei Komponenten eigentliche transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ) und die effektive transversale Relaxationszeit ( $T_2^*$ ), die von lokalen Inhomogenitäten des Magnetfeldes verursacht wird.

Mit Hilfe von zusätzlichen Magnetfeldgradienten kann die Larmorfrequenz ortsabhängig beeinflusst und so die für eine Bildgebung notwendige Ortsauflösung erreicht werden<sup>92</sup>. Die  $T_1/T_2$ -Relaxationszeiten sind für die unterschiedlichen Gewebe des Körpers verschieden, da sie unter anderem von dem Wasser- und Fettgehalt, der Eisenkonzentration und der Viskosität abhängen. Diese Unterschiede werden als unterschiedliche Signalstärken (Helligkeiten) im resultierenden Bild dargestellt und sind damit für den Kontrast des Bildes verantwortlich<sup>61</sup> (Abbildung 3). Für die Entwicklung der Magnet-Resonanz-Tomographie wurden Paul Lauterbur und Sir Peter Mansfield im Jahr 2003 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

### Kontrastmittel und Relaxivität

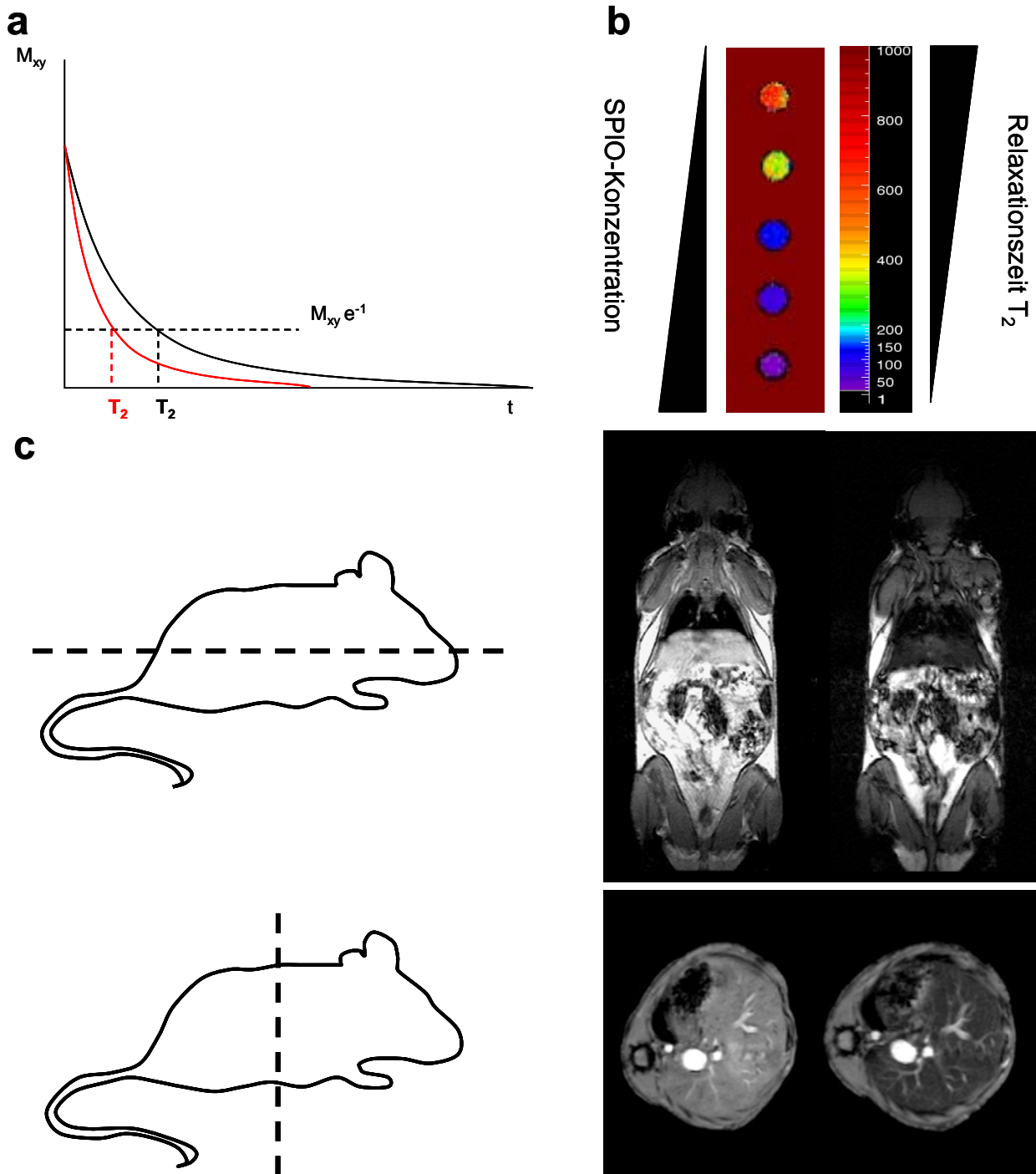
Der Kontrast zwischen zwei Geweben in der MRT-Bildgebung ist die Differenz der Signalintensitäten. Diese Signalintensitäten hängen von der Protonenkonzentration und den Relaxationszeiten ab. In der MRT-Bildgebung kommen zwei Arten von Kontrastmitteln zum Einsatz, zum Einen werden paramagnetische Gadolinium-Komplexe verwendet, welche hauptsächlich die  $T_1$ -Relaxation der Protonen beschleunigen, zum Anderen werden superparamagnetische Nanokristalle aus Eisenoxid verwendet, welche die  $T_2$  und  $T_2^*$ -Relaxationszeit der Protonen verkürzen. Die Wirkung ersterer Verbindungen wird in der Bildgebung durch eine Signalverstärkung dargestellt, daher werden diese als Positiv-Kontrastmittel bezeichnet, die Auswirkung letzterer wird als Signalreduktion dargestellt, daher bezeichnet man sie als Negativ-Kontrastmittel. Kontrastmittel verkürzen die verschiedenen Relaxionszeiten der Protonen in einer Probe oder einem Gewebe und erhöhen somit die Relaxionsrate, welche der Kehrwert der Relaxionszeit ist. In Abbildung 4 ist die Wirkung von superparamagnetischen Nanokristallen aus Eisenoxid auf die  $T_2$ -Relaxationszeiten dargestellt und der Effekt eines Leber-spezifischen Negativ-Kontrastmittel am Beispiel der Maus gezeigt.



**Abbildung 3: Transversale und longitudinale Relaxation als Grundlagen der MRT**

In der MRT richten sich Protonen in einem statischen Magnetfeld ( $B_0$ ) aus. Diese Ausrichtung resultiert in einer Nettomagnetisierung, die einer Präzessionsbewegung ohne Phasenkohärenz mit der Larmorfrequenz, entspricht. Durch einen RF-Puls in der Larmorfrequenz kann die Präzessionsbewegung in Richtung der zum Magnetfeld senkrechten Ebene (also transversal) ausgelenkt werden, wobei es zu einer Reduktion der Nettomagnetisierung entlang des Magnetfeldgradienten (also longitudinal) kommt. Gleichzeitig werden die Kernspins hierbei entlang der dem Magnetfeld senkrechten Ebene in Phase gebracht, was in einer transversalen Nettomagnetisierung resultiert. Anschließend kehrt die Präzessionsbewegung der Magnetisierung wieder in die Ausgangslage zurück. Die Rückkehr der Nettomagnetisierung in ihre Ausgangslage entlang des Magnetfeldes ist dabei die sogenannte longitudinale oder  $T_1$ -Relaxation und der Verlust der transversalen Magnetisierung ist die sogenannte  $T_2$ -Relaxation. Die  $T_1/T_2$ -Relaxationszeiten sind für die verschiedenen Gewebe des Körpers unterschiedlich und werden als unterschiedliche Signalstärken (Helligkeit) im resultierenden Bild dargestellt. Somit wird eine kontrastreiche nicht-invasive Darstellung der Weichteile erreicht, wie hier am Beispiel des MRT-Bildes einer Maus dargestellt.





**Abbildung 4: Superparamagnetische-Nanokristalle als Kontrastmittel in der MRT**

(a) Superparamagnetische-Nanokristalle werden in der MRT-Bildgebung als Kontrastmittel eingesetzt. Sie beschleunigen die  $T_2$  und  $T_2^*$ -Relaxation der Protonen und verkürzen somit die Relaxationszeiten ( $T_2$  und  $T_2^*$ ) (rote Kurve). (b) Die Wirkung einer steigenden SPIO-Konzentration in der Bildgebung auf die Relaxationszeit ist farblich kodiert dargestellt. In der Ganzkörperbildgebung bewirken diese Nanokristalle eine Schwärzung und werden daher als Negativ-Kontrastmittel bezeichnet. Die Wirkung eines leberspezifischen Negativ-Kontrastmittels im sagittalen und transversalen Bild der Maus ist in (c) dargestellt. Das linke Bild ist jeweils vor und das rechte Bild nach der Gabe des Kontrastmittels aufgenommen worden.

Die Wirkungsstärke eines Kontrastmittels wird als Relaxivität bezeichnet. Sie gibt die Steigerung der Relaxationsrate pro Konzentrationseinheit der Paramagnetischen Ionen des Kontrastmittels an und ihre Einheit ist daher  $1 \text{ l}/(\text{mmol}_{(\text{Paramagnetischer Ionen})} * \text{ s})$ . Jedes Kontrastmittel hat immer einen Einfluss auf alle drei Relaxationszeiten ( $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_2^*$ ) und daher auch eine  $r_1$ ,  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität. Diese ist abhängig von vielen Faktoren, unter anderem von der Magnetfeldstärke und der Temperatur sowie in einigen speziellen Fällen auch von der verwendeten Messequenz<sup>61</sup>.

Neben diesen experimentellen Einflüssen, hängen insbesondere die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität von superparamagnetischen Nanokristallen von nachfolgend genannten Eigenschaften der Partikel ab: Umso größer die Magnetisierung des Partikels ist desto höher ist seine  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität, folglich besitzen größere Partikel eine höhere  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität als kleinere Partikel und Materialien mit einer höheren Sättigungsmagnetisierung eine höhere  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität als Materialien mit einer niedrigeren Sättigungsmagnetisierung<sup>93-95</sup>.

## Bisherige Anwendungen von Nanokristallen in der Biomedizin

Auf Grund ihrer exzellenten optischen Eigenschaften werden Halbleiter-Nanokristalle seit mehr als zehn Jahren als neue Klasse von Fluoreszenzmarkierungen für die biomedizinische Forschung eingesetzt<sup>39-41,87,96,97</sup>. Die publizierten Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig und an dieser Stelle sollen nur einige Beispiele genannt werden.

Die Gruppen von Bawendi und Frangioni konnten zeigen, dass es mit Halbleiter-Nanokristallen, die im nahen Infrarot-Bereich emittieren, möglich ist Lymph-Bahnen und vor allem Wächter-Lymph-Knoten intraoperativ darzustellen<sup>17,18,21,22,26,27</sup>. Hierbei sind die Halbleiter-Nanokristalle besonders nützlich, da es kaum geeignete organische Farbstoffe mit einer Emission im nahen Infrarot-Bereich gibt. Dubertret et al.<sup>98</sup> haben gezeigt, dass hydrophobe Nanokristalle in Phospholipid-Mizellen eingebettet werden können. Diese Mizellen wurden in einzelne Zellen eines Xenopus Embryos injiziert um diese zu markieren. So konnte die Autoren auf Grund der sehr guten Photostabilität die Embryogenese über einen langen Zeitraum und über viele Zellteilungen hinweg verfolgen. Mit organischen Farbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen gestaltet sich dieses sehr schwierig. Larson et al. demonstrierten, dass Halbleiter-Nanokristalle auf Grund ihres breiten Absorptionsspektrums und ihrer hohen Photostabilität eine ideale Markierung für die konfokale Multi-Photonen-Mikroskopie sind<sup>77</sup>. Mittels der Nanokristalle konnte so das Gefäßsystem markiert und die Mikrozirkulation verfolgt werden. Ballou et al. zeigten, dass Halbleiter-Nanokristalle auch nicht-invasiv in der Maus dargestellt werden können und dass diese mit einer Polymer-Hülle

eingekapselten Nanokristalle über Monate hinweg ihre Fluoreszenz behielten<sup>99</sup>. Die Gruppe von Dahan hat beschrieben, dass Halbleiter-Nanokristalle ausgezeichnete Markierungen sind um „Single Partikel Tracking“, in diesem Fall die Verfolgung einzelner Rezeptoren, in lebenden Zellen über lange Zeiträume und Trajektorien durchzuführen<sup>9,100-102</sup>. Ein ähnliches Anwendungsbeispiel wurde von der Gruppe von Jovin gezeigt, die mit Hilfe von Halbleiter-Nanokristallen neue Erkenntnis über Signaltransduktion des EGF-Rezeptors in lebenden Zellen gewinnen konnten<sup>6,103-105</sup>. Die Gruppe von Mattoussi zeigte, dass Halbleiter-Nanokristalle hervorragende Donor-Partner für FRET-Assays sind<sup>106</sup>. Wobei neben der hohen Photostabilität auch die über die Kristallgröße kontrollierbare Emissionswellenlänge von großem Nutzen ist. Um die Schwierigkeit der Anregung von Nanokristallen in tiefliegenden Geweben zu umgehen, haben So et al. Nanokristalle mit dem Enzym Luciferase kombiniert. Die Emissions-Energie des Enzyms wird hier über einen Resonanz-Energie-Transfer auf den Nanokristall übertragen, welches dann in seiner charakteristischen Wellenlänge emittiert<sup>107</sup>. Die Gruppe von Roederer machte sich die engen Emissionspektren der Nanokristalle zu Nutze und konnte so Antigen spezifische T-Zellen anhand von 17 verschiedenen Markern gleichzeitig in der Durchflußzytometrie charakterisieren<sup>108</sup>.

Den hervorragenden optischen Eigenschaften steht die chemische Zusammensetzung der Halbleiter-Nanokristalle gegenüber, sie enthalten meistens Cadmium und Selen. Auf Grund der zu erwartenden Langzeit-Toxizität steht diese Zusammensetzung einem Einsatz in der Klinik entgegen<sup>109-111</sup>.

Im Gegensatz zu den Halbleiter-Nanokristallen werden superparamagnetische Nanokristalle aus Eisenoxid bereits seit 20 Jahren als Kontrastmittel in der klinischen Bildgebung eingesetzt<sup>35,112</sup>. Ihr Einsatz ist in der Regel mit wenigen Nebenwirkungen verbunden und das enthaltene Eisen wird in den körpereigenen Eisenstoffwechsels aufgenommen<sup>28</sup>. Im Folgenden sollen beispielhaft einige der zahlreichen publizierten Einsatzmöglichkeiten von Eisenoxid-Nanokristallen beschrieben werden. Hierbei lassen sich passive und aktive Markierungsstrategien unterscheiden.

Bei den passiven Strategien werden die Eisenoxid-Nanokristalle nicht mit Biomolekülen verknüpft, ihre Aufnahme in Zielgewebe und Verteilung im Körper wird über die Größe, Ladung und Oberflächenbeschaffenheit gesteuert. Große Eisenoxid-Partikel (60-150 nm) werden nach der Injektion in die Blutbahn sehr schnell von den Makrophagen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) aufgenommen. Da Metastasen von Tumoren in der Leber und der Milz keine Makrophagen enthalten, werden diese von den injizierten Eisenoxid-Partikeln im MRT-Bild nicht geschwärzt und sind als helle Läsionen erkennbar<sup>35,112</sup>. Die

kommerziellen Kontrastmittel Endorem und Resovist werden hierfür in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Mittels kleinerer monokristalliner Eisenoxid-Nanokristalle, welche als Sinerem (Europa) bzw. Combidex (USA) vertrieben werden, konnten die Gruppen von Weissleder und de la Rosette an Patienten mit Prostata-Krebs erfolgreich mittels nicht-invasiver MRT-Bildgebung Lymphknoten identifizieren, die Metastasen enthalten<sup>113</sup>. Ruehm et al. konnten mit denselben Eisenoxid-Partikeln in Watanabe-Kaninchen zeigen, dass diese von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques aufgenommen werden<sup>114</sup>. Auf diese Weise konnten die atherosklerotischen Plaques mittels MRT dargestellt werden. Kooi et al. haben dieses Konzept in der Folge auch erfolgreich an Patienten demonstrieren können<sup>115</sup>.

Zu den passiven Strategien gehören in gewisser Weise auch die Studien, die Zellen *ex vivo* mit Eisenoxid-Nanokristallen inkubieren, damit diese die Partikel aufnehmen. Die so markierten Zellen können nach der Injektion in den Körper mit hoher Sensitivität nicht-invasiv verfolgt werden. Als Beispiele seien hier Studien aus den Gruppen von Weissleder und Koretsky genannt: Lewin et al. konnten zeigen, dass es mittels des HIV-Tat-Peptids möglich ist, Zellen mit einer hohen Effizienz zu beladen<sup>34</sup>. Kircher et al. demonstrierten, dass Ovalbumin spezifische T-Lymphozyten, die mit Eisenoxid-Nanokristallen markiert wurden, Ovalbumin exprimierende Tumore *in vivo* infiltrieren<sup>116</sup>. Die Gruppe von Koretsky hat gezeigt, dass unter Verwendung von sehr großen Eisenoxid-Partikeln ( $>1 \mu\text{m}$ ) sogar einzelne Zellen und Partikel in der MRT detektiert werden können<sup>117-119</sup>.

Im Fall der aktiven Markierungsstrategien werden die Eisenoxid-Nanokristalle so modifiziert, dass sie eine molekulare Zielstruktur, also ein Antigen oder einen Rezeptor, über ihre Affinität erkennen. Solche Partikel sind die Grundlage für die sogenannte „Molekulare Bildgebung“ in der molekularbiologische Prozesse visualisiert werden. Als erste haben Weissleder und Reimer in der Gruppe von Brady eine solche aktive Markierungsstrategie beschrieben, als sie superparamagnetische Eisenoxid-Nanokristalle mit dem Zucker Arabinogalactan funktionalisiert haben. Diese Partikel binden den Asialoglykoprotein-Rezeptor, welcher nur auf Hepatozyten in der Leber exprimiert wird. Diese Partikel werden hauptsächlich von der Leber aufgenommen, allerdings nicht von den Kupffer-Zellen sondern nur von den Hepatozyten<sup>120,121</sup>. Somit kann auch zwischen verschiedenen Erkrankungen der Leber im MRT differenziert werden<sup>122</sup>. Es waren wiederum Weissleder et al. die im Jahr 2000 als erste auch die transgene Expression des Transferrin-Rezeptors mit Transferrin-gekoppelten Eisenoxid-Nanokristallen im MRT visualisieren konnten<sup>29</sup>. Ichikawa et al. nutzten dieses Konzept, um mit Hilfe der Transferrin-gekoppelten Eisenoxid-Nanokristalle über den transgenen Transferrin-Rezeptor, die Expression von therapeutischen Genen zu

verfolgen<sup>123</sup>. Über Folat-funktionalisierte Eisenoxid-Nanokristalle konnten Tumorzellen, welche den Folat-Rezeptor überexprimieren, detektiert werden<sup>124</sup>. In weiteren Studien wurde der therapeutische Antikörper Herceptin von mehreren Gruppen genutzt, um hierüber den HER2/neu-Rezeptor, den viele Krebszellen überexprimieren, mittels superparamagnetischer Eisenoxid-Nanokristalle in der MRT-Bildgebung zu detektieren<sup>94,125,126</sup>.

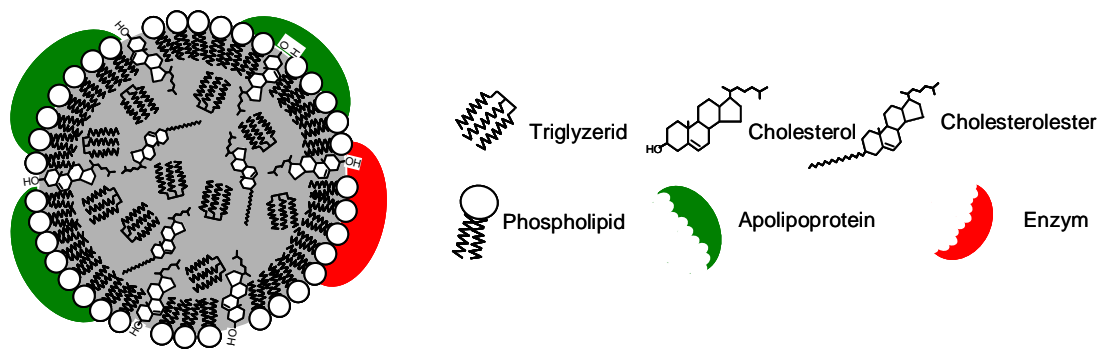
Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanokristallen in der Bildgebung sind die sogenannten „Magnetic Relaxation Switches“. Hierbei „schalten“ funktionalisierte Eisenoxid-Nanokristalle zwischen einem monodispersen und einem aggregierten Zustand hin und her. Bei der Aggregation erhöht sich ihre  $r_2$ -Relaxivität so stark, dass eine deutliche Änderung des MR-Signals messbar ist. Da die Aggregation über molekulare Interaktionen zwischen DNA oder Proteinmolekülen gesteuert werden kann, lassen sich so molekulare Interaktionen im MRT visualisieren<sup>127-134</sup>.

Im Gegensatz zu den konventionellen Markierungstechniken haben Nanokristalle vor allem einen deutlich größeren Durchmesser und ein sehr viel höheres Molekulargewicht<sup>88</sup>. Somit ist ihr Einfluss auf die zu markierende Struktur stärker ausgeprägt. Groc et al. konnten zeigen, dass mit Nanokristallen markierte Antikörper schlechter in den synaptischen Spalt eindringen können<sup>135</sup>. Tekle et al. haben gezeigt, dass Nanokristalle die intrazelluläre Prozessierung der markierten Proteinen verändern<sup>136</sup>. Daher sollte der Einfluss der Nanokristalle auf die Prozessierung der markierten Lipoproteine im Rahmen dieser Arbeit ausführlich charakterisiert werden.

Dem Nachteil des größeren Durchmessers stehen wie oben dargestellt die deutlich besseren physikalischen Eigenschaften der Nanokristalle gegenüber, wodurch man die markierten Biomoleküle sehr viel besser detektieren kann. Dieses ist vor allem bei der *in vivo* Visualisierung von biologischen Prozessen von großem Vorteil<sup>88</sup>.

### *Lipoproteinstoffwechsel*

Lipophile Substanzen werden im Blut auf zwei Arten transportiert. Die meisten Lipide werden in Form von Mizellen aus amphiphilen und hydrophoben Lipiden mit Proteinen transportiert, die als Lipoproteine bezeichnet werden (Abbildung 5)<sup>137</sup>. Die Proteinanteile der Lipoproteine werden als Apolipoproteine bezeichnet. Andere Lipide wie z.B. Steroidhormone und freie Fettsäuren binden als einzelne Moleküle an spezifische Transportproteine.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Lipoproteins**

Lipoproteine sind mizellare Komplexe, welche den Lipidtransport im Blut vermitteln. Ihr hydrophober Kern enthält unpolare Triglyzeride und Cholesterolester und die amphiphile Hülle besteht aus Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen. Neben den Apolipoproteinen sind auch Enzyme wie Lipasen und Transferproteine mit den Lipoproteinen assoziiert.

Die Lipoproteine lassen sich in sechs Hauptklassen unterteilen. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe und Dichte: Chylomikronen (CM), Chylomikronen-Remnants (CR), Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Intermediate Density Lipoproteine (IDL), Low Density Lipoproteine (LDL) und die High Density Lipoproteine (HDL)(Tabelle 1)<sup>138</sup>.

**Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der einzelnen Lipoproteinklassen**

Klasse	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )	Durchmesser (nm)
Chylomikronen	0,93	75-1200
VLDL	0,93-1,006	30-80
IDL	1,006-1,019	25-35
LDL	1,019-1,063	18-25
HDL	1,063-1,210	5-12

In den verschiedenen Lipoproteinklassen ist der Proteinanteil unterschiedlich, er reicht von nur 2% der Gesamtmasse bei Chylomikronen bis zu 50% bei HDL. Außerdem unterscheiden sich die verschiedenen Lipoproteinklassen in ihrer Lipidzusammensetzung (Tabelle 2).

Die Apolipoproteine ApoB100 und ApoB48 können als Strukturproteine nicht zwischen einzelnen Lipoproteinen ausgetauscht werden, da sie auf Grund ihrer  $\beta$ -Faltblattstruktur fest mit den Lipidkomponenten verbunden sind. Andere Apolipoproteine können zwischen verschiedenen Lipoproteinen ausgetauscht werden (z.B. ApoA-I, ApoA-V und ApoE), da sie strukturell in Form von amphipatischen  $\alpha$ -Helices organisiert sind.

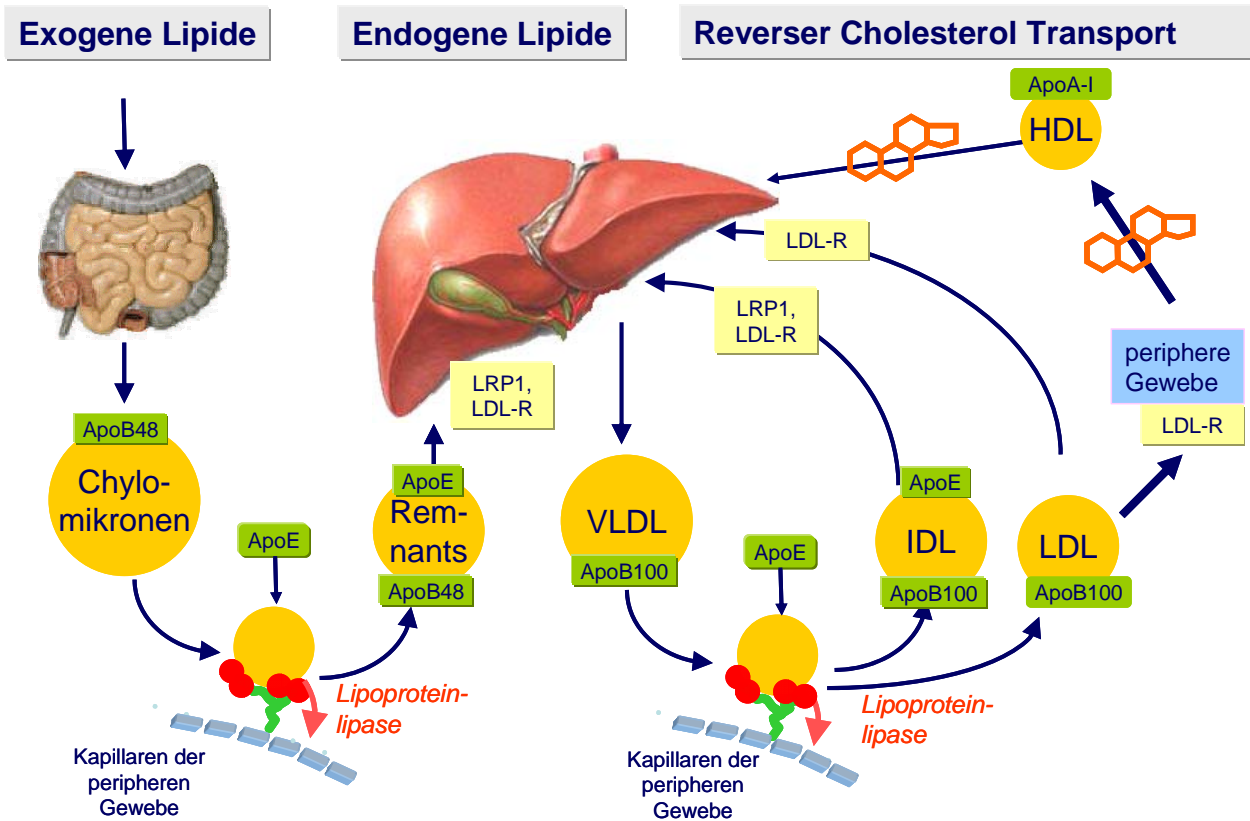
**Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinklassen**

	Oberflächenzusammensetzung (%)			Zusammensetzung des Kerns (%)	
	Cholesterol	Phospholipide	Apolipoproteine	Triazylglyzeride	Cholesterolester
Chylomikronen	2	7	2	86	3
VLDL	7	18	8	55	12
IDL	9	19	19	23	29
LDL	8	22	22	6	42
HDL	5	30	50	2	13

Neben den Apolipoproteinen, welche die strukturelle Stabilität der Partikel gewährleisten oder als Liganden die Bindung an Lipoprotein-Rezeptoren vermitteln, gibt es Enzyme (Lipoproteinlipase (LPL), hepatische Lipase (HL)) und Transferproteine (Lecithin-Cholesterol-Azyl-Transferase (LCAT), Cholesterolestertransferprotein (CETP) und Phospholipidtransferprotein (PLTP)), die mit Lipoproteinen assoziiert vorliegen oder mit diesen interagieren. Vor allem in der HDL-Fraktion wurde zusätzlich eine Vielzahl weiterer Proteine nachgewiesen, welche verschiedenste Funktionen jenseits des bisher beschriebenen Lipoproteinstoffwechsels haben<sup>139</sup>.

Auf der Oberfläche von Zellen exprimierte Lipoproteinrezeptoren binden die Lipoproteine und nehmen diese durch Rezeptor-vermittelte Endozytose auf. Die wichtigste Lipoproteinrezeptor-Familie ist nach dem LDL-Rezeptor benannt. Für die Aufklärung seiner wichtigen Rolle in der Cholesterol-Homöostase sind Goldstein und Brown 1985 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet worden<sup>140-143</sup>. Die Mitglieder dieser Rezeptor-Familie haben, neben ihren Funktionen im Lipoproteinstoffwechsel, weitere Funktionen beispielsweise in der Signaltransduktion, womit sie unter anderem in der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle einnehmen<sup>144,145</sup>. Die beiden wichtigsten Mitglieder dieser Familie für den Lipoproteinstoffwechsel sind nach heutigen Erkenntnissen der LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor-related-Protein (LRP)<sup>146,147</sup>.

Der Lipoproteinstoffwechsel wird in drei Pfade zum Transport von Lipiden unterteilt: Er umfasst das exogene und das endogene, sowie das „reverse“ Cholesteroltransportsystem (Abbildung 6)<sup>137</sup>. Weiter unten wird der Stoffwechsel exogener Lipide, welcher auch als postprandialer Lipoproteinstoffwechsel bezeichnet wird, detailliert behandelt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Lipoproteinstoffwechsels**

Der Lipoproteinstoffwechsel umfasst das exogene und das endogene sowie das „reverse“ Cholesteroltransportsystem. Im exogenen Lipoproteinstoffwechsel werden die Nahrungslipide als Chylomikronen von der Darm-Mucosa sezerniert und enthalten ApoB48. Aus diesen werden in den Kapillaren der peripheren Gewebe durch LPL-Lipolyse die Chylomikronremnants, welche mit ApoE angereichert sind. Diese werden über LRP1 und den LDL-Rezeptor von der Leber aus dem Blut entfernt. Im nüchternen Zustand sezerniert die Leber VLDL mit ApoB100 als Strukturprotein ins Plasma. Diese werden durch LPL-katalysierte Lipolyse zu IDL und LDL. Die mit ApoE angereicherten IDL werden über LRP1 und den LDL-Rezeptor von der Leber aus dem Blut entfernt. Die LDL werden von der Leber und peripheren Geweben über den LDL-Rezeptor aus der Zirkulation entfernt. Überschüssiges Cholesterol wird aus der Peripherie über den reversen Cholesteroltransport mittels HDL zur Leber transportiert.

Über den endogenen Lipidstoffwechselweg versorgt die Leber im nüchternen Zustand die Peripherie mit Lipiden. Hierbei sezerniert sie VLDL mit ApoB100 als Strukturprotein ins Plasma. Diese triazylglyzeridreichen Lipoproteine werden durch LPL-katalysierte Lipolyse zuerst zu IDL und dann zu LDL. Diese werden durch CETP mit verestertem Cholesterol aus HDL angereichert und verbleiben über Tage in der Zirkulation. Der LDL-Rezeptor entfernt die LDL aus der Zirkulation. Dieser Rezeptor wird neben der Leber auch von Zellen in der Peripherie expremiert, diese versorgen sich so zusätzlich zur eigenen Cholesterolsynthese mit Cholesterol.

Während alle Gewebe zur Cholesterolsynthese befähigt sind, besitzt nur die Leber einen Stoffwechselweg, welcher die Ausscheidung von Cholesterol erlaubt. Über die Galle kann sie Cholesterol und Gallensäuren, welche aus Cholesterol synthetisiert werden, in den Darm ausscheiden. Überschüssiges Cholesterol muss also aus den Zellen der Peripherie



ausgeschieden werden und über den reversen Cholesteroltransport zur Leber gelangen<sup>148</sup>. Lipidarme oder lipidfreie HDL-Vorläufer werden hierfür mit Cholesterol aus der Plasmamembran beladen. Eine Schlüsselfunktion bei diesem Prozess nimmt der ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) ein<sup>149-154</sup>. Das freie Cholesterol wird dann durch die LCAT verestert und die HDL nehmen in der Folge an Größe zu. Einerseits werden HDL mit ApoE assoziiert und so zu HDL<sub>E</sub>, die von der Leber aufgenommen werden können, womit der reverse Cholesteroltransport vollzogen ist. Andererseits werden die Cholesterolester durch CETP auf LDL übertragen und in der Folge mit der LDL aus der Zirkulation entfernt<sup>155</sup>.

### *Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel*

#### Intestinale Lipidresorption

Die Nahrungslipide müssen für eine Aufnahme im Darm in amphiphile Komplexe umgewandelt werden. Hierbei werden zunächst durch mechanische Vermischung größere Fetttröpfchen gebildet. Anschließend werden durch oberflächenaktive Substanzen wie Lysophospholipide, Nahrungscholesterin und Gallensäuren kleinere Emulsionspartikel gebildet, welche schließlich von Lipasen in sehr kleine Lipidmizellen umgewandelt werden<sup>156</sup>.

Die Triglyzeride der Nahrungslipide werden im Laufe des Verdauungsprozesses von verschiedenen Lipasen gespalten. Zunächst werden die langkettigen Fettsäuren der Triglyzeride von der pharyngealen Lipase, welche von der Zunge sezerniert wird und mit in den Magen wandert, gespalten<sup>157</sup>. Im sauren Milieu des Magens werden dann von der Magenlipase die kurz- und mittelkettigen Fettsäuren abgespalten. Anschließend werden die Nahrungslipide beim Eintritt in den Darm durch Gallensäuren dispergiert, wo nach die Pankreaslipase die Lipolyse der Triglyzeride fortsetzt und hierbei kleine Lipidmizellen bildet<sup>158</sup>. Diese Mizellen enthalten freie Fettsäuren, Phospholipide, Gallensäuren und 2-Monoazylglyzeride, welche nicht von der Pankreaslipase gespalten werden können.

Beim Kontakt mit den Mikrovilli der Enterozyten kommt es zur Lipidresorption und in diesen Zellen zur sehr schnellen Reveresterung der Fettsäuren. Die Lipide stehen nun zur Bildung der Chylomikronen zur Verfügung.

#### Chylomikronen Synthese und Sezernierung

Die Mucosa-Zellen des Zwölf-Finger-Darms sezernieren die aus dem Darmlumen aufgenommenen Lipide in Form von Chylomikronen<sup>159</sup>. Diese sind zu groß um durch das

fenestrierte Endothel direkt in die Blutbahn zu gelangen und werden daher nicht über die Pfortader (*Vena portae*) in die Leber transportiert. Sie werden in der Lymphe transportiert<sup>160</sup> und die in den Chylomikronen transportierten lipophile Substanzen erfahren somit keinen First-Pass-Effekt. Sie treten über den Milchbrustgang (*Ductus thoracicus*) in den linken Venenwinkel ein. Dieser mündet in die linke *Vena brachiocephalica* und anschließend über die obere Hohlvene (*Vena cava superior*) in den rechten Herzvorhof. Somit treten die Chylomikronen über das Herz in den Lungenkreislauf und erreichen im Anschluss über den arteriellen Kreislauf die Peripherie. Erst nachdem sie die peripheren Organe und Gewebe passiert haben, werden sie über die Pfortader (*Vena portae*) auch in die Leber transportiert<sup>156</sup>. Im Rahmen der Triglyzeridaufnahme erscheinen die sezernierten Chylomikronen eine Stunde nach einer fetthaltigen Mahlzeit im Blut. Nach 5-6 Stunden ist die Triglyzeridaufnahme in der Regel abgeschlossen und somit sind keine Chylomikronen mehr im Blut nachweisbar<sup>161</sup>. Der Triglyzerid-Anstieg nach einer Mahlzeit im Blut ist von der Menge an Nahrungslipide und der individuellen Veranlagung abhängig<sup>162</sup> und kann bei pathophysiologischen Werten zur Atherosklerose Entstehung führen<sup>163</sup>.

## Prozessierung

Chylomikronen, die von den Zellen der Darm-Mucosa in die Lymphe sezerniert werden, haben einen Durchmesser von 80 nm bis zu 1 µm und tragen initial lediglich apoB48, ApoAI und ApoAIV<sup>137</sup>. Erst mit dem Übertritt von der Lymphe in die Blutbahn werden die Chylomikronen durch die LPL hydrolysiert und erwerben einen für aus dem Plasma isolierte Chylomikronen typischen Proteinbesatz. Hierbei werden ApoCII, ApoCIII, ApoAV und ApoE von HDL übertragen, während die LPL zuvor an Heparansulfatproteoglykane(HSPG)-gebunden vorliegt<sup>164-166</sup>. HSPG sind Bestandteil der extrazellulären Matrix der Endothelzellen welche die Auskleidung der Gefäße (Intima) bilden. Insbesondere am Endothel der Gewebe welche die LPL exprimieren, liegt diese an HSPG und das Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) gebunden vor. Diese Gewebe sind das weiße und braune Fettgewebe, sowie der Muskel, insbesondere der Herzmuskel<sup>167-170</sup>.

Im Rahmen der LPL-katalysierten Lipolyse, welche ApoCII und ApoAV als Cofaktoren benötigt<sup>156,167,168,171,172</sup>, werden Triglyceride an der 1- und 3-Position gespalten und Fettsäuren freigesetzt. Diese werden dann von den umliegenden Geweben aufgenommen oder an Albumin gebunden im Blut transportiert<sup>160</sup>. Parallel zur Lipolyse modifizieren das Cholesterinester-Transferprotein (CETP)<sup>155</sup> und Phospholipid-Transferprotein (PLTP)<sup>173</sup> die

Lipidkomposition der Chylomikronen. Die Chylomikronen verlieren im Verlauf der Prozessierung Phospholipide und das CETP vermittelt den Austausch von Triglyceriden gegen Cholesterinester mit der HDL<sup>156</sup>.

Am Ende des Lipolyse Prozesses sind aus den Chylomikronen die sogenannten Chylomikronenremnants (CR) entstanden. Diese sind im Vergleich zu den Chylomikronen kleiner (60-70 nm) und mit Cholesterinestern angereichert<sup>156</sup>. Ihr Proteinbesatz enthält jetzt größere Mengen an ApoE, ApoCII und ApoCIII, ApoAV sowie LPL, welche nach der Lipolyse an der Gefäßwand mit den Remnant-Partikeln assoziiert bleibt<sup>165,174</sup>.

Vor der Lipolyse waren die Chylomikronen zu groß, um durch das fenestrierte Endothel der Lebersinusoiden in den Disse-Raum zu gelangen. Erst die durch Lipolyse verkleinerten Remnants sind klein genug, um das Endothel der Leber zu passieren und über ApoE und LPL an die HSPG zu binden<sup>165,175-179</sup>. Neben der Aufnahme in die Leber und der Milz werden auch im Knochen Chylomikronenremnants aufgenommen. Hierüber wird der Knochen unter anderem mit dem fettlöslichen Vitamin K versorgt<sup>180,181</sup>.

## Aufnahme

Für die Aufnahme von Chylomikronenremnants ist folgender Mechanismus beschrieben worden: Zuerst werden die lipolysierten Remnants im Disse-Raum an die stark sulfatierten HSPG gebunden, ApoE und LpL, welche nach der intravaskulären Lipolyse auf den Lipoproteinpartikel verbleiben, wirken hierbei als Liganden<sup>165,175-179</sup>. Diese ApoE-abhängige Bindung erfolgt sehr schnell und erklärt die kurze Plasma-Halbwertszeit der CR von wenigen Minuten, sie verlängert sich ohne ApoE, wie in ApoE-defizienten Mäusen gezeigt<sup>182-185</sup>, deutlich.

Im Disse-Raum werden die Chylomikronenremnants mit weiteren ApoE Molekülen und der Hepatischen Lipase (HL) angereichert, beide liegen an HSPG gebunden vor. Dabei werden die Remnants von der HL weitergehend hydrolysiert<sup>186,187</sup>. Die Remnants werden anschließend von den Hepatozyten aufgenommen, wobei ApoE, LpL und HL als Liganden fungieren<sup>188-191</sup>. Im Gegensatz zur ersten schnellen Bindung an die HSPGs, ist dieser zweite Schritt langsamer und neben ApoE von Endozytose-Rezeptoren wie LRP1 und dem LDL-Rezeptor abhängig. Dies zeigt sich in LDLR-defizienten Mäusen, die zwar nur eine marginale Veränderung in der Plasma-Halbwertszeit von CR zeigen, aber unter Fettbelastung eine postprandiale Hyperlipidämie entwickeln<sup>184</sup>. Die drei wichtigsten Erkennungsstrukturen für CR in der Leber sind der LDL-Rezeptor<sup>184,192-194</sup>, der ApoE als Ligand bindet und das LRP1<sup>184,192-194</sup>, das ApoE<sup>146</sup>, LpL<sup>175</sup> und HL<sup>179,186,187,195</sup> erkennt, sowie die HSPG, die auch

alle drei Proteine binden können<sup>179,196,197</sup>. Diese drei Erkennungsstrukturen wirken hierbei allerdings nicht unabhängig voneinander, sondern auf Grund der Größe der Chylomikronenremnants sowie der Vielzahl von Ligandenmolekülen auf ihrer Oberfläche kooperativ. Hierbei dominiert die Funktion der HSPG im ersten sehr schnellen Schritt der Aufnahme der CR in den Disse-Raum. Für den zweiten, im Vergleich langsamen, Schritt der zellulären Aufnahme in Hepatozyten sind dann hauptsächlich die beiden Rezeptoren verantwortlich.

Insbesondere die überlappende Funktion zwischen den beiden Oberflächenrezeptoren und den HSPG erschwert die Aufklärung des Aufnahmemechanismus der Chylomikronenremnants sehr und wird nach wie vor kontrovers diskutiert<sup>196</sup>. Beispielsweise werden die Expression und Degradation des LDL-Rezeptors und LRP1 gegenläufig reguliert, so dass eine Inaktivierung des einen Rezeptors zu einer kompensatorischen Hochregulation des anderen Rezeptors führt<sup>198</sup>. Weiterhin sind LRP1 und die HSPG auch für eine Vielzahl anderer physiologischer Prozesse wichtig<sup>144,145,199</sup>, so dass eine Defizienz in diesen Strukturen im Mausmodell embryonal letal ist, was das Studium ihrer Funktion im Mausmodell erschwert.

## Degradation und Recycling

Die intrazelluläre Prozessierung der Chylomikronenremnants unterscheidet sich von dem von Goldstein und Brown aufgeklärten Endozytose-Weg der LDL<sup>140</sup>. Während LDL in perinukleären Lysomen degradiert wird, werden die Remnants in peripheren Endosomen prozessiert<sup>200-202</sup> und desintegrieren<sup>203</sup>. Der Lipidkern und das ApoB48 werden lysosomal degradiert, während sogenannte Surface-Remnants welche ApoE, ApoCs und die LPL enthalten, in den peripheren Endosomen von dem Lipidkern getrennt und zur Plasmamembran transportiert werden<sup>204</sup>. Dieser Recycling-Weg unterscheidet sich von dem klassischen Transferrin-Recycling-Pathway<sup>203</sup>. Bei Anwesenheit von Akzeptor-Molekülen wie lipidfreiem ApoAI oder HDL<sup>204</sup> werden diese Surface-Remnants recycled<sup>205,206</sup>. Durch diesen Mechanismus „entkommt“ ApoE der lysosomalen Degradation, was auch *in vivo* gezeigt werden konnte<sup>207</sup>.

## Kinetik

Die Halbwertszeit von postprandialen Lipoproteinen im Blut ist sowohl beim Menschen als auch bei der Maus äußerst kurz. Dieses erschwert die Untersuchung der postprandialen Lipoproteine im Vergleich zu HDL und LDL deutlich. LDL und HDL haben Halbwertszeiten von mehreren Stunden bzw. Tagen<sup>166,208-210</sup>.

Zur Untersuchung der Kinetik des Chylomikronen- und VLDL-Metabolismus werden in den meisten Studien stabile oder radioaktive Isotope als Markierung eingesetzt<sup>211</sup>. Bei diesen Methoden wird in Blutproben die Konzentration der verwendeten Isotope in der Chylomikronen- und VLDL-Fraktion sowie dem restlichen Plasma gemessen. Mit Hilfe von mathematischen Modellen, die mehrere Kompartments und Übergangswege zwischen diesen erfassen, werden aus den zeitlichen Veränderungen der Isotopenkonzentration die Kinetiken errechnet<sup>212,213</sup>. Für diese Modellierung mit einer Vielzahl von Variablen bedarf es etlicher Annahmen über die Größe der Kompartments. Diese Grundannahmen wirken sich in erheblichem Maße auf die errechneten Ergebnisse aus. Die meisten Modelle basieren auf linearen Zusammenhängen, die unter den experimentellen Gegebenheiten nicht erfüllt sind. Oft wird versucht eine konstante Konzentration der Chylomikronen oder VLDL in dem Experiment zu erreichen, um den linearen Zusammenhängen der Modelle gerecht zu werden<sup>211,214</sup>. Weiterhin wird seit einigen Jahren die Konzentration von  $^{13}\text{C}^{215}$  oder  $^{14}\text{C}^{216}$  haltigem Kohlendioxid in der Atemluft von Tieren und Probanden als Nachweis für die Verstoffwechslung von mit diesen Isotopen markierten Lipoproteinen genutzt<sup>217</sup>. Die Modellierung ist in diesem experimentellen Aufbau aber noch komplizierter, da ein sehr viel komplexeres Netzwerk von Stoffwechselwegen durchlaufen wird.

Andere Studien verwenden isolierte und radioaktiv markierte Lipoproteine, injizieren diese und verfolgen die Abnahme der Lipoproteinkonzentration im Blut<sup>165,171,177,178,218-221</sup>. Ein weiterer Ansatz, um speziell den Chylomikronenstoffwechsel zu untersuchen, ist die Messung des Anstiegs und Abfalls der ApoB48-Konzentration nach einer Mahlzeit<sup>222-224</sup>. Oftmals wurde auch Retinol bzw. Retinolpalmitat als Markierung verwendet<sup>225</sup>. Dieses wird als Nahrungszusatz verabreicht und anschließend wird über die Retinolesterkonzentration im Blut der Chylomikronenstoffwechsel analysiert. Hierbei hat sich allerdings der Transfer von Retinolestern aus Chylomikronen in anderen Lipoproteinfraktionen, welcher bis zu 25 % ausmacht, als großes Hindernis in der Interpretation der Daten erwiesen<sup>226,227</sup>.

Die Halbwertszeit von Chylomikronen im Blut wird aus Experimenten mit stabilen bzw. radioaktiven Isotopen markierten Lipoproteinen auf weniger als 5 Minuten geschätzt<sup>166,210,228</sup>. Die Angabe für die Halbwertszeit von VLDL unterscheiden sich in verschiedenen Studien auf Grund der beschriebenen Schwierigkeiten deutlich<sup>211</sup>. Sie liegen zwischen 30 Minuten<sup>229</sup> und mehr als 3 Stunden<sup>230</sup>.

Alle genannten Methoden sind in ihrer zeitlichen Auflösung, die im Bereich von einigen Minuten pro Messpunkt liegt, begrenzt. Diese Auflösung ist im Bereich der Plasma-Halbwertszeit der postprandialen Lipoproteine und erschwert daher eine adäquate

Bestimmung der Halbwertszeit. Weiterhin kann keine der genannten Methoden die Organaufnahme-Kinetik der Lipoproteine, welche mechanistisch die Plasma-Halbwertszeit reguliert, messen.

Trotz der sehr viel kürzeren Plasma-Halbwertszeiten liegen die triglyzerid-reichen Lipoproteine (TRL) (postprandiale Lipoproteine und VLDL) in vergleichbaren Massenkonzentrationen zu LDL und HDL vor. Diese Tatsache unterstreicht den enormen Massenfluss und die riesige Transportkapazität der TRL, welche HDL und LDL um zwei Größenordnungen überschreitet. Auf Grund der kurzen Halbwertszeiten und starken Abhängigkeiten von der Nahrungszusammensetzung sowie der individuellen Veranlagung gestaltet sich die Untersuchung des TRL-Metabolismus jedoch relativ schwierig. Daher wird auch das Verständnis der Bedeutung pathophysiologischer Veränderungen des TRL-Metabolismus in der Atherosklerose-Entstehung erschwert.

Auf Grund dieser Probleme sollten im Rahmen dieser Arbeit Nanokristalle zur Markierung von postprandialen Lipoproteinen verwendet werden. Die Markierung mit Nanokristallen würde deutliche Verbesserungen in der räumlichen und zeitlichen Auflösung der Visualisierung des Lipoproteinstoffwechsels erlauben. Durch den Einsatz der MRT sollte mit Eisenoxid-Nanokristallen auch eine zeitlich hochaufgelöste Messung der Kinetik der Leberaufnahme von postprandialen Lipoproteinen möglich werden.

### *Markierung von Lipoproteinen mit Nanokristallen*

Lipoprotein bestehen wie oben beschrieben aus einem Lipid- und einen Proteinanteil. Diese lassen sich mit verschiedenen Strategien markieren.

Um den Proteinanteil der Lipoproteine zu markieren, wird in der Regel versucht die Markierung kovalent an Aminosäure-Reste zu koppeln. Hierbei bieten sich Nanokristalle die auf der Oberfläche eine funktionelle Gruppe wie eine Carbonsäure tragen an um diese an Aminogruppen der Lipoproteine zu koppeln.

Zur Lipidmarkierung der Lipoproteine werden nicht wie bei der Proteinmarkierung kovalente Bindungen zwischen Nanokristallen und Lipiden geknüpft, da hierfür die einzelnen Lipidmoleküle zu klein sind. Stattdessen wird versucht, die Markierung lipophil zu funktionalisieren und diese dann in die Lipidphase, welche von der Gesamtheit der einzelnen Lipidmoleküle gebildet wird, zu integrieren. Die Gruppen von Glickson und Fayad nutzten beispielsweise eine Assoziation von amphiphilen organischen Farbstoffen und paramagnetischen Lipidmolekülen um LDL<sup>231-234</sup> und HDL<sup>235-239</sup> in der amphiphilen Oberfläche zu markieren. Dieses ist mit Nanokristallen aber nicht möglich.

Für einige Lipoproteine, insbesondere die postprandialen Lipoproteine, ist es auch möglich eine proteinfreie Lipid-Emulsion aus einer physiologischen Lipidmischung zu präparieren und anschließend die austauschbaren Apolipoproteine (ApoAs, ApoCs und ApoE) zu assoziieren<sup>240</sup>. Diesen so synthetisierten rekombinanten Lipoproteinen fehlt lediglich das ApoB48, welches auf Grund seiner amphiphilen  $\beta$ -Faltblatt Struktur nicht frei von einer Lipidoberfläche handhabbar ist. Dem ApoB48 fehlt jedoch die Domäne, welche den LDL-Rezeptor bindet. Daher scheint dieses Protein für die intravaskuläre Prozessierung und die Aufnahme der Chylomikronen in die Zielgewebe nicht notwendig zu sein. In diese rekombinanten Lipoproteine lassen sich auch sehr hydrophobe Moleküle zur Markierung einbringen, die komplett wasserunlöslich sind, da die physiologische Lipidmischung vor der Präparation der Emulsion in Gemischen von Chloroform und Alkoholen gelöst ist<sup>240</sup>. Für *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass es nicht nötig ist die Apolipoproteine zu assoziieren, da dies im Plasma initial geschieht und diese Emulsionen analog zu postprandialen Lipoproteinen verstoffwechselt werden<sup>218,219</sup>.

Liu et al. haben ein solches Modellsystem für Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) beschrieben<sup>241</sup>, bei dem sie lipophile Halbleiter-Nanokristalle in VLDL-ähnliche Emulsionen eingebettet haben. Für HDL-Lipoproteinen wurde von den Gruppen von Mulder und Mirkin Modellsysteme etabliert, welche ebenfalls hydrophobe Nanokristalle im Kern tragen<sup>91,242-244</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein analoges rekombinantes Modell für postprandiale Lipoproteine entwickelt, welches lipophile Nanokristalle in seinem Lipidkern trägt. Dieses Modell, welches in Anlehnung an den Begriff Liposomen als „Nanosomen“ bezeichnet wird, besitzt die physiologische Lipidkomposition von humanen postprandialen Lipoproteinen<sup>3</sup>.

## Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit sollte eine Methodik zur Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels mit Hilfe von Nanokristallen etabliert werden. Dazu wurden im ersten Teil dieser Arbeit die physikalischen und chemischen Eigenschaften der verschiedenen Nanokristalle untersucht und im zweiten Teil die Eignung der Nanokristalle zur Visualisierung des Lipoproteinstoffwechsels dargestellt.

### Charakterisierung der physikalischen und chemischen Eigenschaften

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanokristallen handelt es sich um kolloidale Systeme, deren physikalischen Eigenschaften von der kolloidalen Stabilität abhängig sind. Entscheidend für diese Stabilität ist die Art und Beschaffenheit der Hülle aus organischen Molekülen, welche Bestandteil des Nanoteilchens sind, aber nicht zum Kristallkern gehören. Um auf der Teilchenoberfläche binden zu können, bedarf es geeigneter funktioneller Gruppen wie zum Beispiel Thiol-, Amin- oder Carbonsäuregruppen in den Stabilisatormolekülen. Bei den meisten Nanokristallsystemen kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen freien Stabilisatormolekülen in der Lösung und gebundenen Stabilisatormolekülen auf der Nanokristalloberfläche. Die Stabilisatormoleküle verhindern entweder über sterische oder elektrostatische Effekte, also beispielsweise gegenseitige Abstoßung negativer Ladungen eine Aggregation der Nanokristalle<sup>41,71</sup>.

Wenn die Nanokristalle nun in eine Umgebung transferiert werden, welche entweder dazu führt, dass es zu einer chemischen Modifikation der Stabilisatormoleküle kommt oder ihr Gleichgewicht zwischen Oberfläche und Lösung gestört wird, kann es zum Verlust der kolloidalen Stabilität kommen<sup>41,96,245</sup>. Dies hat zur Folge, dass die Nanokristalle aggregieren und hierbei ihre physikalischen Eigenschaften stark verändert werden<sup>109</sup>. Daher ist es im Rahmen dieser Arbeit wichtig gewesen, die Effekte der biologischen Umgebungen, in denen die Nanokristalle als Markierung genutzt werden sollten, systematisch zu untersuchen und insbesondere die physikalischen Eigenschaften der Nanokristalle unter diesen Bedingungen zu beobachten.



## Halbleiter-Nanokristalle aus wässrigen Synthesen

Als erstes Nanokristallsystem wurden CdTe-Halbleiter-Nanokristalle aus wässrigen Synthesen untersucht. Diese Teilchen sind die kleinsten verfügbaren Halbleiter-Nanokristalle. Sie bestehen lediglich aus einem CdTe-Kern und einer Hülle aus den sehr kleinen Stabilisator-Molekülen Mercaptopropionsäure oder Thioglykolsäure. Die Stabilisatoren binden über die Thiolgruppe auf der Teilchenoberfläche<sup>59</sup>. Diese ladungsstabilisierten Nanokristalle wurden in verschiedenen physiologischen Puffersystemen untersucht<sup>1</sup>. Die untersuchten Puffer werden für die Kopplungsreaktionen von Proteinen und Nanoteilchen sowie in Immunfluoreszenzfärbungen oder Lebendzellversuchen genutzt<sup>94,96,97,246,247</sup>. Um den Effekt der Größe des Nanokristalls zu untersuchen, wurden verschiedene Größen verwendet. Die Entwicklung des Emissionsspektrums der Nanokristalle wurde über 5 Tage verfolgt.

Interessanterweise zeigte die Fluoreszenz-Intensität in vielen Puffern einen linearen Abfall über die Zeit. Dieses Verhalten trat für die meisten Puffersysteme aber hauptsächlich für die Nanokristalle mit einem größeren Durchmesser auf. Ab einem ausreichend kleinen Durchmesser waren die Nanokristalle oftmals stabil und die Fluoreszenz-Intensität somit konstant über die Zeit der Untersuchung. Die bessere „chemische“ Stabilität der kleineren Nanokristalle steht im Gegensatz zur Stabilität gegenüber dem Ausbleichen, wo größere Nanokristalle eine höhere Stabilität zeigen<sup>245</sup>. In einigen der Puffersysteme war der Abfall in der Fluoreszenz-Intensität auch mit einer Verbreiterung und einer Rot- oder Blauverschiebung des Emissionsspektrums verbunden. Die Rotverschiebung ist wahrscheinlich durch eine langsam fortschreitende Aggregation der Nanokristalle erklärbar. Die Alternative einer Ostwald-Reifung ist bei der geringen Temperatur und der kurzen Zeitspanne der Untersuchung unwahrscheinlich. Die Blauverschiebung des Emissionsspektrums könnte durch eine partielle Auflösung der Nanokristalle erklärt werden, wodurch die Kristalle kleiner werden und somit mit einer kürzeren Wellenlänge emittieren. Hierbei würden dann Cadmium- und Tellur-Ionen freigesetzt werden, welche beide in biologischen Experimenten auf Grund ihrer starken Toxizität stören würden<sup>109,110</sup>.

Da sich bei dieser Untersuchung eine Vielzahl von unabhängigen und abhängigen Variablen ergeben, wurden die Ergebnisse systematisch ausgewertet und - soweit zugänglich - drei Größen ermittelt, welche das Verhalten der Nanokristalle in den jeweiligen Puffern charakterisieren: Der **Abfall des Fluoreszenz-Signals pro Zeiteinheit** für die Nanokristallfraktion mit dem größten Durchmesser, ein **kritischer Durchmesser** unterhalb dessen die Nanokristalle keine Abnahme in der Fluoreszenz-Intensität zeigten und das

Ausmaß der **spektralen Verschiebung** des Emissionsmaximums nach 2 Stunden Inkubation. Mittels dieser drei Größen lässt sich die Stabilität verschiedener Nanokristalle in unterschiedlichen Puffern gut vergleichen. Eine solche systematische Untersuchung der Stabilität von Quantum Dots in physiologischen Puffersystemen ist zuvor in der Literatur nicht beschrieben worden, einige Publikationen aus der Gruppe von Alivisatos hatten zuvor lediglich auf die Probleme der TGA und MPA-stabilisierten Systeme hingewiesen<sup>41,96</sup>. Daher wurde diese Arbeit bereits in einigen anderen Arbeiten zitiert<sup>58,88,248-266</sup>.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Nanokristalle aus wasserbasierten Synthesen prinzipiell auch in biologischen Puffersystemen eingesetzt werden können. Allerdings zeigten die verwendeten Nanokristalle eine geringe Stabilität in Puffersystemen mit Sulfonsäuregruppen, welche vor allem für die Kopplung von Carbonsäuregruppen und Aminogruppen eingesetzt werden, einer Standardstrategie zur Markierung von Proteinen.

Des Weiteren waren alle verwendeten Nanokristalle in sauren Puffersystemen mit einem pH-Wert von 5 nicht stabil. Dieses lässt Probleme bei der Verfolgung der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Proteinen und Lipoproteinen erwarten, da der pH-Wert in späten Endosomen und Lysosomen unter diesen Wert abgesenkt ist und somit diese Nanokristalle in diesen intrazellulären Vesikeln nicht mehr detektiert werden können. Das Verhalten lässt sich auf Grund der chemischen Eigenschaften der Halbleiter-Nanokristalle erklären. Möglicherweise zeigen Nanokristalle mit zusätzlichen anorganischen Schalen (sogenannte Kern-Schale- und Kern-Schale-Schale-Nanokristalle) eine deutlich bessere Stabilität im leicht sauren Milieu. Falls dies der Fall ist, ließe sich die Instabilität der einfachen Nanokristalle durch Verwendung einer Mischung von einfachen und Kern-Schale-Nanokristalle mit verschiedenen Emissionswellenlängen nutzen, um die intrazelluläre Prozessierung von Nanokristallen über ihre Emission zu verfolgen. Wenn die Mischung der Nanokristalle in die sauren Vesikel der Zellen gelangt, verlieren die einfachen Nanokristalle ihre Emission und das Fluoreszenzspektrum der Mischung ändert sich, somit könnte die Prozessierung verfolgt werden. Neben einer Mischung zweier Nanokristalle könnten auch sogenannte Dual-Emitter verwendet werden, dies sind Kern-Schale-Schale Nanokristalle die in zwei Wellenlängen emittieren<sup>267,268</sup>. Eine der Emissionen erfolgt aus dem von zwei Schalen geschützten Kern und eine aus der äußeren und damit ungeschützten Schale. Die äußere Schale sollte hierbei zuerst ihre Emission verlieren<sup>268</sup>.

Weiterhin wurde die Fluoreszenz-Intensität in Zellkultur-Medium und Paraformaldehyd-haltigen Puffersystemen enorm beeinträchtigt, was den Einsatz dieser Nanokristalle in der Lebendzellmikroskopie sowie der Immunfluoreszenz fixierter Zellen nahezu ausschließt.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu publizierten Daten der Gruppen von Nie, Maysinger, Schmidt, Studer und anderen, welche einen Einsatz von den untersuchten Nanokristallen in zellbiologischen und physiologischen Versuchen vorschlagen<sup>97,246,269-271</sup>. Systematische Stabilitätsuntersuchungen wurden von diesen Gruppen jedoch bislang nicht publiziert. Allerdings weisen auch die Gruppen von Alivisatos und Parak in ihren Publikationen auf die geringe Stabilität dieser Nanokristalle in biologischen Systemen hin<sup>41,96</sup>. Da auf Grund der oben genannten Stabilitätsprobleme der Einsatz von CdTe-Nanokristallen aus wasserbasierten Synthesen für die Markierung und anschließende Visualisierung von Lipoproteinen invalide erschien, wurde in der Folge auf den Einsatz dieser Nanokristalle verzichtet.

### Superparamagnetische Nanokristalle aus organometallischen Hochtemperatursynthesen

Neben den Halbleiter-Nanokristallen sind vor allem die superparamagnetischen Eisenoxid (SPIO) Nanokristalle als Markierung für die Magnet-Resonanz-Tomographie interessant<sup>28,29,61</sup>. Um an Lipoproteine koppelbare Nanokristalle zu erhalten, wurde folgende Strategie gewählt: Zuerst wurden hydrophobe SPIO Nanokristalle in einer organometallischen Hochtemperatursynthese hergestellt. Um diese Nanokristalle wasserlöslich zu machen, wurde ein Ligandenaustausch durchgeführt. Hierfür wurden Methylether-Polyethylenglykol(PEG)-Moleküle mit verschiedenen Molekulargewichten jeweils mit einer Phosphatgruppe funktionalisiert und hiermit die aus der Synthese stammenden Stabilisatoren ausgetauscht (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung). Ab einem Molekulargewicht von 550 g/mol sind diese Nanokristalle in wässrigen Lösungen stabil ohne dass eine Aggregation auftritt. Auf diese Art wurden drei wasserlösliche SPIO-Nanokristalle mit unterschiedlich langen PEG-Molekülen auf der Oberfläche erhalten. Diese Nanokristalle werden über sterische Wechselwirkungen der Stabilisatoren in Lösung gehalten, daher sind sie erwartungsgemäß in allen getesteten Puffersystemen stabil<sup>15-17,272-276</sup>, auch bei Variation des pH-Wertes und in hochmolaren Lösungen. Diese Stabilität wurde zuvor von den Gruppen von Parak und Bawendi in vergleichbar stabilisierten Systemen gezeigt. Somit sind auf diese Art funktionalisierte Nanokristalle sehr viel stabiler in physiologischen Puffersystemen. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber den oben diskutierten ladungsstabilisierten Nanokristallen. PEG-Moleküle werden in der Biomedizin häufig an Zielstrukturen (Antikörper, Liposomen oder auch Nanoteilchen) gekoppelt, um eine unspezifische Bindung von Plasmaproteinen zu verhindern<sup>15-17,272-274,276-278</sup>. Somit kann in den meisten Fällen die Zirkulationszeit im Blut

verlängert werden (von wenigen Minuten auf einige Stunden), da die Zellen des RES die PEGylierten Moleküle weniger effektiv erkennen und aus dem Blutkreislauf entfernen. Man erhofft sich so eine bessere Bindung an die Zielstrukturen, da man die konkurrierende unspezifische RES-Aufnahme unterdrückt.

Um zu testen, ob die PEG-Moleküle die unspezifische, also nicht Rezeptor-abhängige, Aufnahme in Zellen des RES verringern, wurden murine Makrophagen mit den verschiedenen Nanokristallen inkubiert und das intrazelluläre Eisen angefärbt. In diesen Versuchen zeigte die PEG-Hülle mit 1100 g/mol Molekulargewicht die besten Ergebnisse, also die geringste Aufnahme in die Makrophagen im Vergleich zu den anderen PEG-Hüllen. Unter den gleichen Inkubationsbedingungen wurde ferner mittels eines Zell-Vitalitätstests überprüft, ob die PEGylierten Nanokristalle zytotoxische Effekte zeigen. Die verwendeten Nanokristalle zeigten keine messbare Zytotoxizität, selbst in der höchsten Konzentration war keine Beeinträchtigung der Zellstoffwechselrate detektierbar (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung).

Weiterhin ist es für SPIO-Nanokristalle die als Kontrastmittel in der Magnet-Resonanztomographie eingesetzt werden wichtig, dass diese nicht nur in physiologischen Puffersystemen sondern auch im Serum stabil sind. Serum ist der nicht-zelluläre Anteil des Blutes, welcher durch Gerinnung und anschließende Zentrifugation gewonnen wird. Es hat im Vergleich zu physiologischen Puffern eine hohe Protein- und Lipidkonzentration und enthält eine komplexe Mischung niedermolekularer Substanzen.

Um die Stabilität im Serum zu testen, wurden die verschiedenen PEG-stabilisierten Nanokristalle mit Serum inkubiert (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung). Im Serum liegt eine Vielzahl biologischer Komplexe vor, so dass das Aggregationsverhalten nicht mittels der dynamischen Lichtstreuung untersucht werden konnte, da die biologischen Komplexe auf Grund ihrer hohen Konzentration und großen Streustärke stören. Als alternative Methode wurde die Größenausschluß-Chromatographie mittels einer Gelfiltrationssäule genutzt. Mit der gewählten Methode kann sowohl zwischen monomer vorliegenden Nanokristallen und ihren Aggregaten unterschieden werden, als auch eine Anlagerung von Plasmaproteinen an einzelne Nanokristalle von einer Dimer- oder Oligomer-Bildung abgegrenzt werden.

Von den verwendeten PEG-Molekülen konnte nur das Molekül mit einem Molekulargewicht von 1100 g/mol die SPIO-Nanokristalle im Serum so stabilisieren, dass es nicht zur Bildung von Aggregaten kam. Allerdings zeigten auch diese im Serum stabilen Nanokristalle nach der Inkubation eine leichte Zunahme in ihrem hydrodynamischen Radius. Diese Zunahme war

allerdings zu klein um durch eine Dimer-Bildung erklärt zu werden. Vermutlich binden einige Proteine aus dem Serum an die PEG-Hülle, obwohl diese genau diesen Vorgang verhindern sollte. Als mögliche Kandidaten für die Bindung an die PEG-Hülle wurden von Kim et al neben Albumin unter anderem die Apolipoproteine ApoA1 und ApoE genannt<sup>279</sup>. Weitere Untersuchungen zur Adsorption von Plasmaproteinen an die hier verwendeten Nanokristalle stehen jedoch noch aus.

Somit konnte gezeigt werden, dass PEG-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 1100 g/mol eine optimale Hülle für SPIO-Nanokristalle darstellen. Die so funktionalisierten Teilchen zeigen eine hohe Stabilität in Serum, eine geringe unspezifische Aufnahme in Makrophagen und keine Zytotoxizität. Des Weiteren stellen diese Nanokristalle mit einem hydrodynamischen Radius von lediglich 10 nm und ihrer geringen unspezifischen Aufnahme in Zellen des RES ideale Kandidaten für die Markierung von Proteinen und Lipoproteinen dar. Diese sollten als Kontrastmittel für den Blutkreislauf auf Grund ihrer PEG-Hülle den bisher von Taupitz et al. beschriebenen Nanokristallen mit Citrat als Stabilisator<sup>280</sup> überlegen sein.

### Charakterisierung der Relaxivitäten von verschiedenen funktionalisierten SPIO-Nanokristallen

Während man für Fluorophore ihre Effizienz oft als Quantenausbeute angibt, ist das Maß für die Effizienz eines MRT-Kontrastmittels seine Relaxivität. Beide, sowohl die Quantenausbeute für Halbleiter-Nanokristalle als auch die Relaxivität für die SPIO-Nanokristalle, hängen in großem Maße von dem Aggregationszustand, also der kolloidalen Stabilität, ab. Aggregieren Halbleiter-Nanokristalle sinkt meist die Quantenausbeute. Es kommt zu spektralen Verschiebungen des Emissionsmaximums und Streueffekte treten auf. Auch die Relaxivität von SPIO-Nanokristallen hängt von ihrem Aggregationszustand ab, allerdings sind die Zusammenhänge hier wesentlich komplexer und eine Aggregation wirkt sich nicht zwingend nachteilig auf die Relaxivitäten aus<sup>281</sup>.

Zur Untersuchung des Einflusses von Teilchengröße, Art der Hülle und Aggregationszustand/Kompartimentalisierung auf die Relaxivität von SPIO-Nanokristalle wurden Mangan-Ferrit-Nanokristalle mit verschiedenen Durchmessern in organometallischen Hochtemperatursynthesen hergestellt. Um den Einfluss verschiedener Hüllen auf die Relaxivität zu testen, wurden diese Teilchen mittels verschiedener Strategien in eine wässrige Umgebung transferiert<sup>2</sup>. Zum einen wurde ein Ligandenaustausch durchgeführt, bei dem die aus der Synthese stammenden Liganden gegen ein Copolymer, welches aus zwei

Polyethylenglykol-Molekülen gekoppelt an ein verzweigtes Polyethylenimin-Molekül (PEG-PEI) besteht, substituiert<sup>282</sup>. Zum anderen wurden die hydrophoben Nanokristalle in eine amphiphile Polymer-Hülle eingekapselt die quervernetzt wurde<sup>283</sup>. Ferner wurden die hydrophoben Nanokristalle ohne eine weitere Oberflächenmodifikation in große Mizellen aus einer physiologischen Lipidkomposition, den so genannten Nanosomen, eingebettet. Im Unterschied zu den ersten beiden Strategien sind die Nanokristalle hier in dem begrenzten Raum der Mizelle konzentriert und so kompartmentalisiert. Sowohl beim Ligandenaustausch als auch bei der Einkapselung liegen die Nanokristalle einzeln vor.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde vor allem der Einfluss der verschiedenen Modifikationen auf die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivität gemessen, diese sind für Negativ-Kontrastmittel wie SPIO-Nanokristalle wichtiger als die  $r_1$ -Relaxivität, welche weiter unten diskutiert wird.

Für die SPIO-Nanokristalle mit den PEG-PEI-Liganden auf der Oberfläche und die SPIO-Nanokristalle, welche in die Polymer-Hülle eingekapselt wurden, stiegen die  $r_2$  und die  $r_2^*$ -Relaxivitäten mit steigendem Teilchendurchmesser. Die  $r_2^*$ - und  $r_2$ -Relaxivitäten waren hierbei gleich. Die Steigerung des Nanokristall-Durchmessers hatte bei den eingekapselten SPIO-Nanokristallen einen stärkeren Einfluss auf den Anstieg der Relaxivitäten als bei den SPIO-Nanokristallen mit einem Ligandenaustausch. Allerdings nahm bei eingekapselten Nanokristallen auch der Mangengehalt mit steigender Teilchengröße ab, so dass neben der Teilchengröße auch die Zusammensetzung des Nanokristallkerns einen Einfluss haben könnte. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit den von Lee et al. beschriebenen Effekten, da vor allem die Relaxivitäten der Mangan-Ferrit-Nanokristalle die publizierten Werte nicht erreichen konnten, sondern eher niedriger als vergleichbare Eisenoxid Nanokristalle lagen<sup>94,284</sup>. Die von Lee et al. beschriebenen Relaxivitäten lassen sich jedoch mit den von Gillis et al. und Matsumoto et al. aufgestellten theoretischen Modellen für monomere SPIO-Nanokristalle nicht erklären<sup>93,95,285</sup>. Diese hohen Relaxivitäten würden sich jedoch durch Aggregation der SPIO-Partikel erklären. Dieses wird von Lee et al. aber nicht diskutiert und würde den Nutzen der von ihnen beschriebenen Partikel für die molekulare Bildgebung zweifelhaft erscheinen lassen. Kürzlich haben auch Roca et al.<sup>286</sup> die Relaxivitäten von Eisenoxid-Nanokristallen untersucht, die sie genauso wie Lee et al.<sup>94</sup> funktionalisiert haben. Roca et al. haben vergleichbare Relaxivitäten zu Lee et al. gemessen, allerdings haben sie gezeigt, dass die Partikel nicht als Monomer sondern in Form von Aggregaten vorliegen.

Die gleichen Nanokristalle welche für den Ligandenaustausch und die Einkapselung verwendet wurden, sind auch in Nanosomen eingebettet worden. Die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten

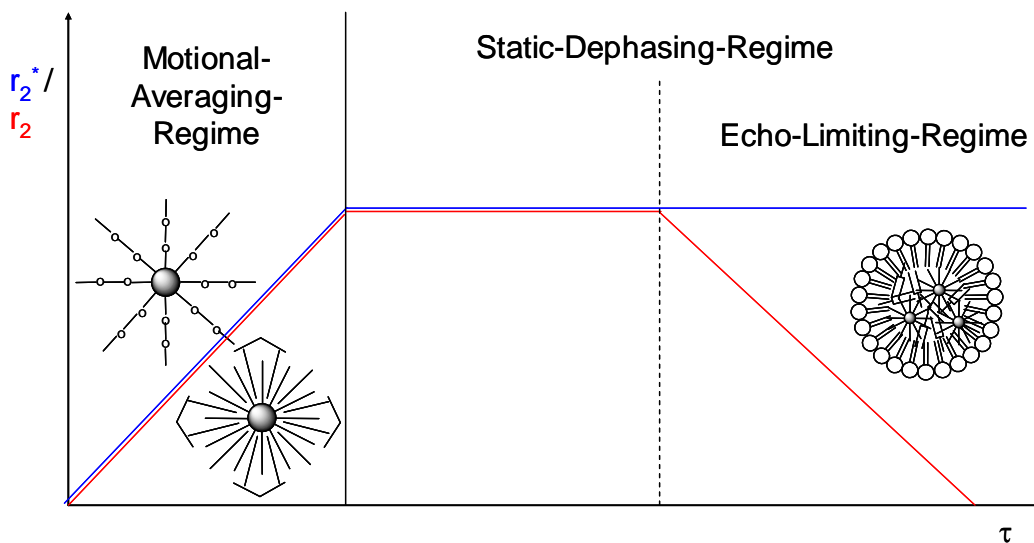
der SPIO-Nanokristalle in den Nanosomen unterschieden sich deutlich von den Relaxivitäten der identischen SPIO-Partikel, welche eingekapselt oder mit PEG-PEI funktionalisiert wurden. Sowohl die  $r_2$  als auch die  $r_2^*$ -Relaxivität waren deutlich größer. Vor allem unterschieden die sich die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten der SPIO-Nanopartikel in den Nanosomen, die  $r_2^*$ -Relaxivitäten waren deutlich größer als die  $r_2$ -Relaxivitäten.

Das Verhalten der Relaxivitäten der Polymer-funktionalisierten und eingekapselten SPIO-Nanopartikel lässt sich mittels des „Motional Averaging Regime“ (MAR) oder „Motional Narrowing Regime“ (MNR) beschreiben<sup>93,285</sup>. Hierbei wird angenommen, dass die Diffusion der Wassermoleküle in der Umgebung der SPIO-Nanopartikel sehr viel schneller ist als die Änderungen der Resonanzfrequenz. In diesem Regime sind die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten gleich. Mit einer Steigerung des Partikeldurchmessers steigt in diesem Regime auch die  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten<sup>93,285</sup>.

Die Relaxivitäten großer Partikel oder mehrerer kleiner Partikel, welche kompartmentalisiert sind und sich somit eventuell gegenseitig beeinflussen, kann allerdings nicht mehr mit dem MAR beschrieben werden. Das Verhalten dieser Partikel wird mit dem „Static Dephasing Regime“ (SDR) und dem „Echo Limiting Regime“ (ELR) beschreiben<sup>287</sup>. Hierbei wird angenommen, dass magnetische Inhomogenitäten vorliegen, die SPIO-Nanopartikel, deren Wirkradius so groß ist, dass die Diffusion der Wassermoleküle für die Erklärung der Relaxivitäten vernachlässigbar ist. In dem SDR ist auch eine Obergrenze für die  $r_2^*$ -Relaxivität beschrieben, so dass auch eine weitere Vergrößerung des Wirkradius keine Steigerung mehr zur Folge hat. In diesem Regime sind abhängig von der Echozeit der verwendeten Messsequenz deutliche Unterschiede zwischen den  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten zu erwarten<sup>287</sup>.

Im SDR und ELR sollten die  $r_2^*$ -Relaxivitäten maximiert und gegenüber Änderungen in der Kompartmentalisierung konstant sein. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da sich somit die  $r_2^*$ -Relaxivitäten der SPIO-Nanokristalle in den Nanosomen auch im lebenden Organismus nicht allzu stark im Rahmen der Prozessierung und Organaufnahme ändern sollten. Für monomere SPIO-Nanokristalle wie die polymer-funktionalisierten SPIO-Nanokristalle oder auch Resovist ist von anderen Gruppen gezeigt worden, dass diese nach der Aufnahme in Zellen *in vitro* oder *in vivo* ebenfalls kompartmentalisiert werden. Somit können ihre Relaxivitäten nicht länger in dem MAR beschrieben werden, sondern ebenfalls im SDR<sup>281,288,289</sup>. Da die Transition vom MAR in das SDR mit einer starken Änderung der Relaxivitäten (bis zu einer Größenordnung) verbunden ist, welche *in vivo* bei der Bindung und zellulären Aufnahme im Zielgewebe abläuft, ist es für diese SPIO-Nanokristalle nicht

möglich ihre Konzentration in der MRT-Bildgebung zu messen. Ihre Relaxivität zum Zeitpunkt der Messung kann nicht vorhergesagt werden. Somit lässt sich zum Beispiel auch nicht zwischen einer Anflutung der SPIO-Nanokristalle im Gewebe und ihrer Kompartimentalisierung unterscheiden. Die Anflutung führt zu einem Anstieg ihrer Konzentration, die Kompartimentalisierung ist jedoch nicht notwendigerweise mit einer Konzentrationsänderung verbunden, aber die Relaxivitäten werden dramatisch gesteigert. Beide Prozesse bewirken eine Verstärkung des gemessenen Kontrasts.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung vom Motional-Averaging-Regime, Static-Dephasing-Regime und Echo-Limiting-Regime**

Abhängig davon ob die Nanokristalle monodispers vorliegen oder in Nanosomen kompartimentalisiert sind, werden ihre  $r_2^*/r_2$  – Relaxivitäten vom Motional-Averaging- oder Static-Dephasing-Regime beschrieben. Innerhalb des Static-Dephasing-Regimes gibt es zusätzlich das Echo-Limiting-Regime, in welchem die  $r_2^*$ -Relaxivität konstant bleibt, die  $r_2$ -Relaxivität aber abhängig von der Messsequenz stark absinkt.

Aus diesem Grund eignen sich Nanosomen im Gegensatz zu monomeren SPIO-Nanokristallen für die quantitative  $T_2^*$ -gewichtete dynamische MR-Bildgebung. Die Abbildung 7 erklärt schematisch die  $r_2^*/r_2$  – Relaxivitäten in Abhängigkeit von MAR, SDR und ELR. Wie weiter unten diskutiert wird, kann man daher die Nanosomen nicht nur für die *in vivo* Visualisierung sondern auch die Quantifizierung mittels MRT einsetzen<sup>3</sup>.

Für Kontrastmittel ist neben der Relaxivität des Kontrastmittels vor allem das Verhältnis von  $r_2$  zu  $r_1$ -Relaxivität entscheidend<sup>61</sup>. Negativ Kontrastmittel haben in der Regel mindestens eine zwanzigfach höhere  $r_2$  als  $r_1$  Relaxivität, sie sind also in der  $T_2$  und  $T_2^*$ -Bildgebung wirkungsvoll. Da der Einfluss ihrer  $r_1$ -Relaxivitäten vergleichsweise gering ist, werden diese und das Verhältnis von  $r_2$  zu  $r_1$  oftmals vernachlässigt und nur der absolute Wert ihrer  $r_2$  und  $r_2^*$ -Relaxivitäten diskutiert. Positiv-Kontrastmittel sollten ein möglichst kleines Verhältnis



von  $r_2$  zu  $r_1$  besitzen, die in der klinischen Diagnostik angewandten paramagnetischen Gadolinium-Chelate habe in der Regel ein  $r_2/r_1$ -Verhältnis zwischen 1 und  $2^{61}$ . Allerdings sind die absoluten Werte ihrer Relaxivitäten niedrig im Vergleich zu SPIO-Nanokristallen (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die Gadolinium-basierten Positiv-Kontrastmittel haben sich in der klinischen Diagnostik als sehr nützlich für die Erkennung und Beurteilung von pathologischen Veränderungen erwiesen und werden daher viel häufiger als die Negativ-Kontrastmittel eingesetzt. Allerdings ist kürzlich gezeigt worden, dass die Gabe von einigen Positiv-Kontrastmitteln bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion mit dem Auftreten der systemischen nephrogenen Fibrose verbunden ist<sup>290</sup>. Diese Erkrankung ist irreversibel und führt bei schwerem Verlauf zum Tode des Patienten. Da gerade Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion, was eine häufige Erkrankung im höheren Lebensalter darstellt, auch eine Kontrastmitteluntersuchung mit einer konzentrierten Natrium-Iodid-Lösung mittels Computer-Tomographie schlecht vertragen, besteht ein erhöhter Entwicklungsbedarf für Positiv-Kontrastmittel ohne toxische Schwermetallionen<sup>290</sup>.

Neuwelt et al.<sup>291,292</sup> und Tombach et al.<sup>293</sup> haben gezeigt, dass sich auch SPIO-Nanokristalle aus Eisenoxid als Positiv-Kontrastmittel eignen, sofern ihre  $r_2$ -Relaxivität ausreichend gering ist<sup>280</sup>.

Bisherige Publikationen verwenden unter anderem Citrat-stabilisierte Nanokristalle<sup>280</sup>, welche auf Grund ihrer Ladung eine relativ geringe Stabilität im Serum und eine kurze Plasma-Halbwertszeit haben sollten. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Ulrich Tromsdorf versucht PEGylierte SPIO-Nanokristalle zu synthetisieren, welche eine hohe Stabilität im Serum, eine geringe Aufnahme in Zellen des RES, sowie ein möglichst kleines Verhältnis von  $r_2$  zu  $r_1$ -Relaxivität zeigen (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die  $r_1$ -Relaxivität von SPIO-Nanokristallen ist meistens deutlich höher als die von Gadolinium-basierten Kontrastmitteln. Allerdings ist die  $r_2$ -Relaxivität oft zu hoch für den Einsatz als Positiv-Kontrastmittel. Daher wurde versucht, die  $r_2$ -Relaxivität möglichst gering zu halten. Wie von anderen Gruppen gezeigt<sup>94</sup> und oben diskutiert<sup>2</sup>, steigt die  $r_2$ -Relaxivität mit steigendem Durchmesser. SPIO-Nanokristalle mit einem Durchmesser von 4 nm zeigten ein besseres  $r_2/r_1$ -Verhältnis als SPIO-Nanokristalle mit einem Durchmesser von 6 nm. Daher sollten SPIO-Nanokristalle nicht größer als 5 nm sein, wenn sie als Positiv-Kontrastmittel eingesetzt werden sollen. Somit konnte ein optimaler Durchmesser für den Kern der SPIO-Nanokristalle bestimmt werden. Weiterhin ist bekannt und oben diskutiert<sup>2</sup>, dass ein aggregationsbedingter Anstieg im hydrodynamischen Radius stark mit einem Anstieg der  $r_2$ -

Relaxivität korreliert, daher sollte dieser Radius möglichst gering gehalten werden. Entsprechend dieser Überlegung zeigte das PEG-Molekül, welches zum geringsten hydrodynamischen Durchmesser der SPIO-Nanokristalle führte, auch das kleinste  $r_2/r_1$ -Verhältnis. Weiterhin sollten jegliche Aggregationen der Nanokristalle im Serum vermieden werden, da diese zu einem dramatischen Anstieg der  $r_2$ -Relaxivität führen. Erwartungsgemäß zeigten daher auch die Nanokristalle mit dem 1100 g/mol PEG-Molekül auf der Oberfläche, welches die höchste Stabilität im Serum hatte, das beste  $r_2/r_1$ -Verhältnis im Serum. Da diese Funktionalisierung der SPIO-Nanokristalle auch zur geringsten Aufnahme in Zellen des RES führte und keinerlei Zytotoxizität zeigte, ist dieses Teilchen ein idealer Kandidat für ein zukünftiges Positiv-Kontrastmittel für MRT-Untersuchung frei von toxischem Gadolinium. Diese Nanokristalle könnten somit in der Zukunft ein wichtiges Werkzeug in der klinischen Diagnostik darstellen.

### Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels

Die Charakterisierung der wasserlöslichen Halbleiter-Nanokristalle hat gezeigt, dass eine Markierung des Proteinanteils von postprandialen Lipoproteinen mit diesen wasserlöslichen Nanokristallen nicht erfolgversprechend ist. Dies liegt daran, dass die Halbleiter-Nanokristalle keine ausreichende Stabilität in der physiologischen Umgebung zeigten<sup>1</sup>.

Mit den PEG-stabilisierten SPIO-Nanokristallen stand zum Ende der Arbeit ein im Serum stabiles Nanokristall-System zur Verfügung. Dieses trägt jedoch noch keine funktionelle Gruppe, wie beispielsweise eine Carbonsäure-Gruppe, welche eine Kopplung an einen Proteinrest ermöglichen würde (Tromsdorf et al., Manuskript in Vorbereitung). Daher wurde die Strategie der Proteinmarkierung zur Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde eine Markierung des Lipidanteils der Lipoproteine angestrebt.

Eine direkte Markierung des Lipidanteils von isolierten postprandialen Lipoproteinen war nicht möglich, da die lipophilen Nanokristalle keinerlei Löslichkeit in wässrigen Puffern zeigten. Somit war eine einfache Assoziation, analog zu amphiphilen organischen Farbstoffen und paramagnetischen Lipidmolekülen wie sie von der Gruppe von Glickson für LDL<sup>231-234</sup> und von der Gruppe von Fayad für HDL<sup>235-239</sup> beschrieben wurde, nicht möglich.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein rekombinantes Modell für postprandiale Lipoproteine entwickelt, welches lipophile Nanokristalle in seinem Lipidkern trägt. Dieses Modell, welches in Anlehnung an den Begriff Liposomen als „Nanosomen“ bezeichnet wird, besitzt die physiologische Lipidkomposition von humanen postprandialen Lipoproteinen<sup>3</sup>. Liu

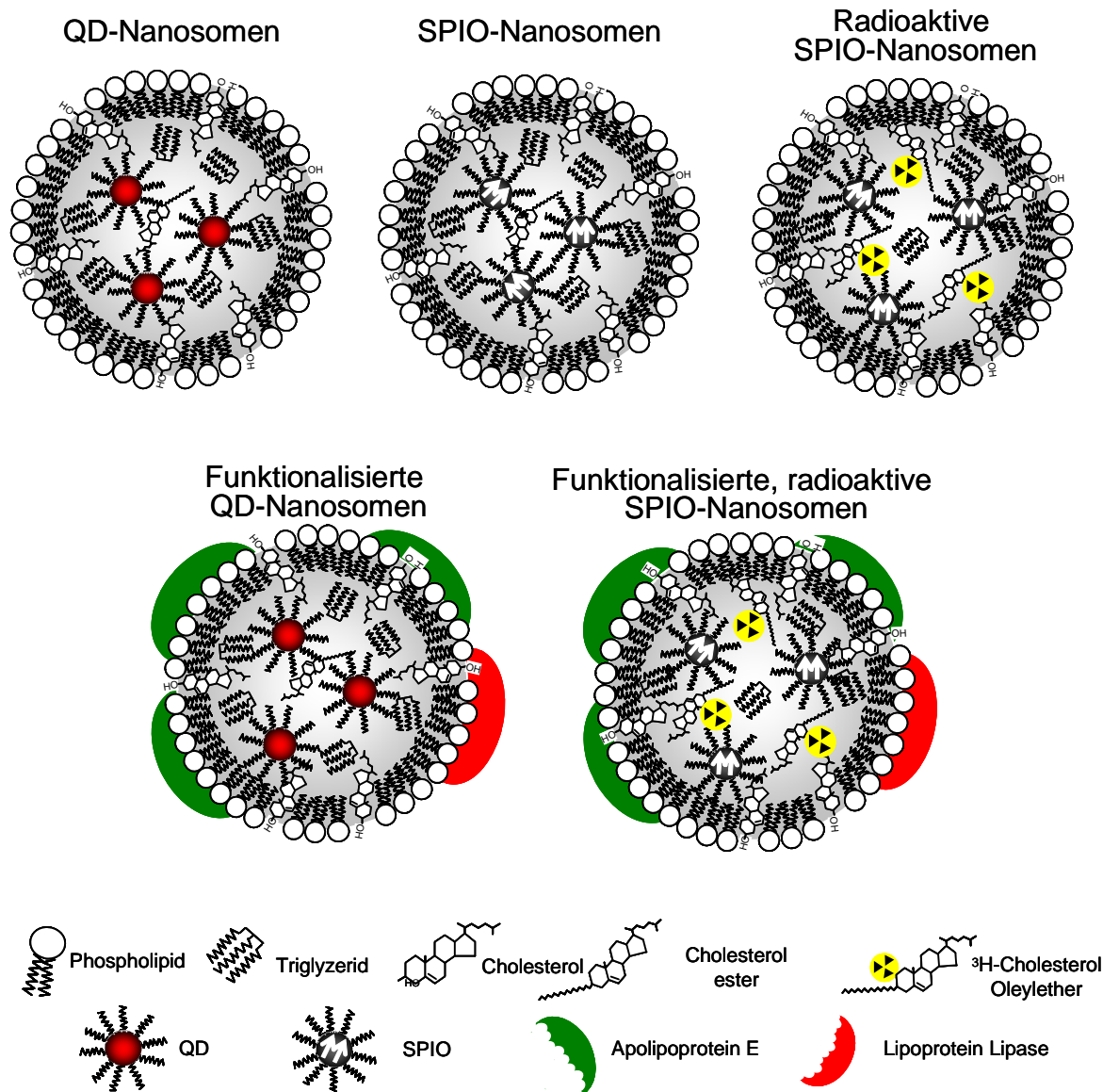
et al. haben unabhängig von uns ein ähnliches Modellsystem für VLDL und Halbleiter-Nanokristalle beschrieben<sup>241</sup>. Für HDL-Lipoproteinen wurde von den Gruppen von Mulder und Mirkin Modellsysteme etabliert, welche ebenfalls hydrophobe Nanokristalle im Kern tragen<sup>91,242-244</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, wie in Abbildung 8 gezeigt, Nanosomen mit Core-Shell-Shell-Halbleiter Nanokristallen (QD-Nanosomen) und SPIO-Nanokristallen (SPIO-Nanosomen) hergestellt. Für Aufnahmeexperimente mit humanen Hepatomazellen und primären murinen Hepatozyten in Zellkultur wurden die Nanosomen mit Apolipoprotein E (ApoE) und Lipoprotein Lipase (LPL) funktionalisiert, um ein physiologisches Modell für humane postprandiale Lipoproteine zu erhalten. Für *in vivo* Experimente konnte auf die Assoziation mit ApoE und LPL verzichtet werden, da auch native Chylomikronen kein ApoE und keine LPL tragen, wenn sie aus der Lymphbahn in den Blutkreislauf sezerniert werden und diese Proteine im Verlauf der intravaskulären Prozessierung der Chylomikronen zu den Chylomikronen-Remnants mit diesen assoziiert werden<sup>137,164-166</sup>. Um auch quantitative Messungen von Nanosomen-Bindung und Aufnahme durchzuführen, wurden diese in einigen Experimenten zusätzlich mit radioaktiven Lipiden markiert<sup>3</sup>.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, Messung des hydrodynamischen Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung sowie Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass Nanosomen eine zu Chylomikronen vergleichbare Größe haben und die hydrophoben Nanokristalle im Lipidkern gelöst und homogen verteilt sind. Die Lipidkomposition entsprach wie erwartet der Zusammensetzung von humanen triglyzeridreichen Lipoproteinen und sowohl ApoE wie auch LPL ließen sich mit den Nanosomen assoziieren, um diese so zu funktionalisieren. Die QD-Nanosomen zeigten nahezu identische Emissionsspektren wie die zur Markierung verwendeten Halbleiter-Nanokristalle in Chloroform. Die charakteristische Signatur der Absorptionsspektren war in den Reflexionsspektren der Nanosomen erkennbar.

Die SPIO-Nanosomen zeigen die identische Magnetisierungskurve wie die zur Markierung verwendeten Eisenoxid-Nanokristalle. Auch nach der LPL-vermittelten Lipolyse der Nanosomen, welche die Lipidkomposition der Nanosomen von Chylomikronen hin zu Chylomikronenremnants verschob, blieben die Nanokristalle im Lipidkern gelöst und es war keine Freisetzung dieser nachweisbar. Somit stellen die Nanosomen ein geeignetes Modell für humane Lipoproteine dar, welches die gleiche Lipidzusammensetzung hat und im Lipidkern stabil mit SPIO oder QD-Nanokristallen markiert ist. Entscheidend ist hierbei, dass die physikalischen Eigenschaften der Nanokristalle nicht beeinträchtigt werden. Dieses ist ein

großer Vorteil gegenüber anderen Markierungsstrategien, wo die Nanokristalle zunächst wasserlöslich gemacht werden müssen. Oftmals werden hierbei die physikalischen Eigenschaften der Nanokristalle stark beeinflusst, für die häufig verwendeten MPA und TGA-stabilisierten Nanokristalle<sup>97,246,269-271</sup> konnte dieses im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt werden<sup>1</sup>.

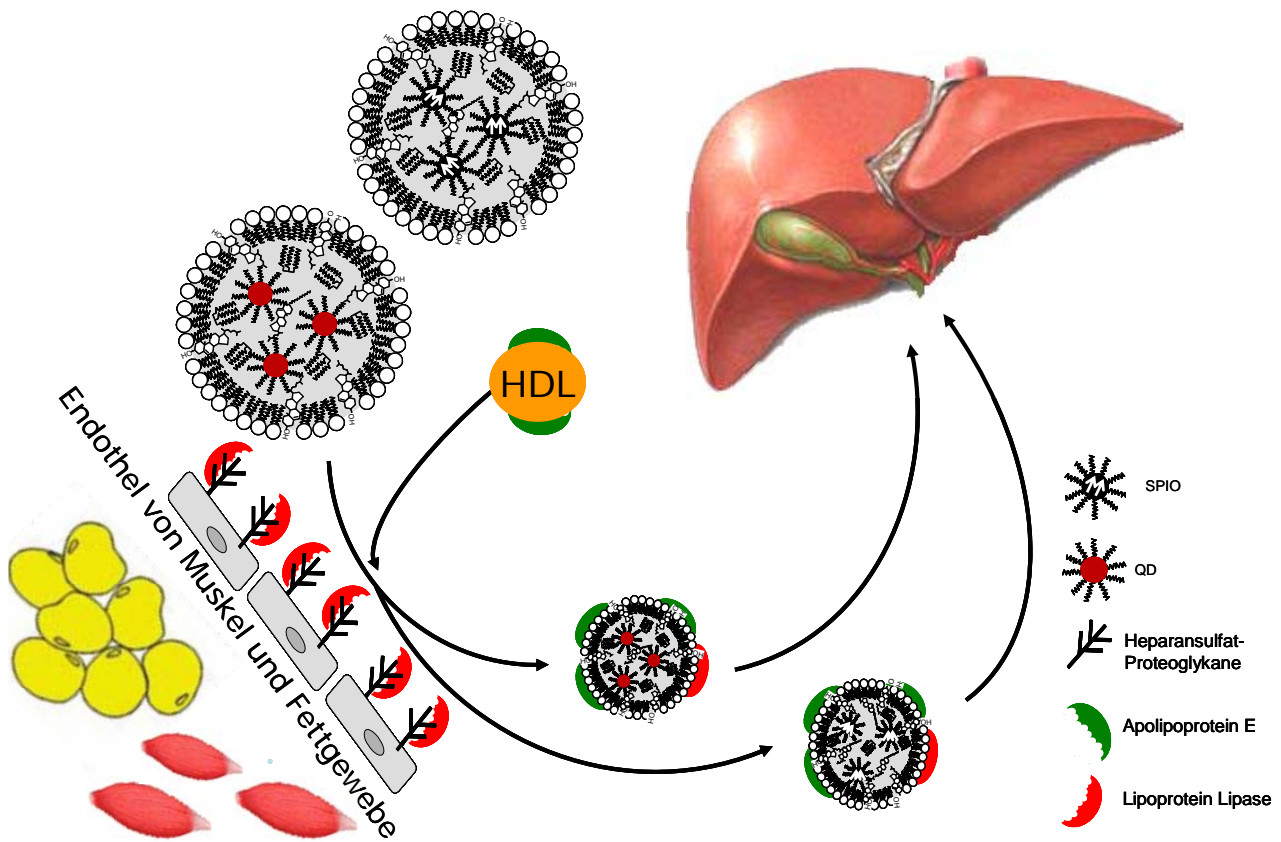


**Abbildung 8: Nanosomen**

Es wurden Nanosomen mit Core-Shell-Shell-Halbleiter-Nanokristallen (QD-Nanosomen) und SPIO-Nanokristallen (SPIO-Nanosomen) hergestellt. Für Experimente in Zellkultur wurden die Nanosomen mit Apolipoprotein E (ApoE) und Lipoprotein Lipase (LPL) funktionalisiert um ein physiologisches Modell für humane postprandiale Lipoproteine zu erhalten. Für quantitative Messungen der Nanosomen-Konzentration wurden diese zusätzlich mit radioaktiven Lipiden markiert.

In Zellkulturversuchen mit Leberzellen konnte gezeigt werden, dass Nanosomen über ApoE und LPL spezifisch an die Zellen binden und aufgenommen werden. Die Aufnahme von ApoE funktionalisierten SPIO-Nanosomen konnte durch einen Überschuss an ApoE-

funktionalisierten Mizellen ohne Nanokristalle gehemmt werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Nanokristalle in den Nanosomen die ApoE-vermittelte Aufnahme nicht stören.



**Abbildung 9: Nanosomen als Modell für postprandiale Lipoproteine**

Im Muskel und Fettgewebe werden die QD- und SPIO-Nanosomen analog zu Chylomikronen durch LPL(rot)-vermittelte Lipolyse hydrolysiert und damit in der Größe vergleichbar zu Chylomikronenremnants. In der Folge werden diese mit ApoE (grün), welches zuvor an HDL gebunden war, angereichert. Die prozessierten Nanosomen werden über ApoE und LPL, die nach der Lipolyse mit dem Partikel assoziiert bleibt, sehr schnell von der Leber aus der Zirkulation entfernt.

Um den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel *in vivo* zu visualisieren, wurden QD- und SPIO-Nanosomen intravenös appliziert. Auf Grund der hohen  $r_2$  bzw.  $r_2^*$  Relaxivitäten der SPIO-Nanosomen konnte die Organaufnahme von postprandialen Lipoproteinen erstmals mittels MRT-Bildgebung nicht-invasiv dargestellt werden. Die Nanosomen wurden, wie für postprandiale Lipoproteinen beschrieben<sup>180,218</sup>, hauptsächlich in die Leber, die Milz und den Knochen aufgenommen. Diese Aufnahme konnte mittels der fluoreszierenden QD-Nanosomen auch in Gewebeschnitten dieser Organe mikroskopisch untersucht werden. Hierbei zeigten die Nanosomen in der Leber eine Anreicherung in dem Disse-Raum und eine Aufnahme in Hepatozyten. Mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) konnten die SPIO-Nanokristalle der Nanosomen in Hepatozyten nachgewiesen werden.

Eine Bindung an Proteoglykane im Disse-Raum sowie eine Aufnahme in Hepatozyten ist allerdings nur möglich, wenn die Nanosomen im Blutkreislauf zuvor von der gefäßständigen LPL hydrolysiert werden und somit auf unter 100 nm verkleinert werden. Erst dann können die Nanosomen das fenestrierte Endothel der Leber passieren. Um diese Prozessierung nachzuweisen, wurden QD-Nanosomen intravenös injiziert und nach einer Minute in der Blutzirkulation wieder aus dem Blut reisoliert.

Des Weiteren konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass *in vivo* auch ApoE von HDL auf die Nanosomen transferiert wird und diese somit nach kurzer Zeit das für die Bindung und Aufnahme in der Leber wichtige Apolipoprotein tragen. Die Prozessierung der Nanosomen entspricht somit auch *in vivo* dem Verhalten von postprandialen Lipoproteinen. Abbildung 9 stellt den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel an Hand der Nanosomen dar.

Wie oben bereits diskutiert, lassen sich die besonders hohen  $r_2^*$ -Relaxivitäten der SPIO-Nanosomen mittels des SDR beschreiben. Aus den *in vitro* Messungen lässt sich daher vermuten, dass die Nanosomen trotz Bindung, Prozessierung und zelluläre Aufnahme in der Leber *in vivo* die gleiche  $r_2^*$ -Relaxivität haben wie *in vitro*. Um dieses zu überprüfen, wurde zu erst mit Hilfe von radioaktiven SPIO-Nanosomen die Organverteilung 20 Minuten nach der Injektion gemessen. Hierdurch konnte bestimmt werden, welcher Anteil der injizierten Nanosomen in die Leber aufgenommen wird und somit welche SPIO-Konzentration in der Leber vorlag. Um die  $r_2^*$ -Relaxivität der Nanosomen in der Leber zu bestimmen, wurden dann fünf verschiedene Verdünnungen der Nanosomen injiziert und jeweils die  $R_2^*$ -Relaxationsrate des Lebergewebes mit SPIO-Nanosomen und die Differenz zum unkontrastierten Gewebe bestimmt. So kann die  $r_2^*$ -Relaxivität der SPIO-Nanosomen *in vivo* bestimmt werden. Wie die Theorie des SDR erwarten lässt<sup>95,287</sup>, ist die  $r_2^*$ -Relaxivität der SPIO-Nanosomen *in vivo* und *in vitro* gleich hoch. Somit sind die SPIO-Nanosomen nicht nur geeignet mittels „Molekularer Bildgebung“ den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel zu visualisieren. Sie lassen sich sogar auf Grund ihrer konstanten  $r_2^*$ -Relaxivität mittels MRT quantifizieren. Dieses war für SPIO-markierte Biomoleküle zuvor noch nicht beschrieben worden und stellt einen wichtigen Schritt für die Etablierung einer quantitativen „Molekularen Bildgebung“ dar.

Da die  $r_2^*$ -Relaxivität der Nanosomen konstant ist, lässt sich ihre Konzentration mittels einer  $T_2^*$ -gewichteten dynamischen MRT-Sequenz ermitteln. Um nun die Aufnahme-Kinetik von postprandialen Lipoproteinen in die Leber erstmals mit einer Zeitauflösung von wenigen Sekunden zu messen, wurde bei narkotisierten Mäusen ein Katheter in die Schwanzvene gelegt und alle 5 Sekunden eine  $T_2^*$ -gewichtete Aufnahme der Leber gemacht. Unter laufender Bildgebung wurden die SPIO-Nanosomen injiziert und ihre Aufnahme in die Leber

in Echtzeit verfolgt. Auf diese Art konnte erstmals die sehr schnelle Kinetik der Leberaufnahme für postprandiale Lipoproteine *in vivo* mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden.

Die Gruppe von van Berkel hat zuvor den Stoffwechsel von Lipoprotein-ähnlichen Emulsionen in Ratten und Mäusen mittels radioaktiver Lipide untersucht und hierbei neben der Organverteilung auch den zeitlichen Verlauf der Plasma-Clearance und der Leberaufnahme bestimmt<sup>294</sup>. Unter anderem wurden hierbei auch mit radioaktivem Cholesterololeat markierte triglyzeridreiche Emulsionen mit einem Durchmesser von 150 nm untersucht. Diese Partikel, welche kleiner sind als die 250 nm großen Nanosomen, zeigten eine vergleichbare Organverteilung, wobei die Leber, das Herz und die Milz die stärkste Aufnahme zeigten. Um den zeitlichen Verlauf der Leberaufnahme zu messen, schnürten Rensen et al. in dieser Studie nach jeweils 2, 10, 30, 45 und 60 Minuten einen Leberlappen ab und bestimmten in diesem die aufgenommene Radioaktivität. Hierbei konnten sie zeigen, dass die Emulsionen innerhalb von 10 Minuten nach der Injektion aus dem Blut in die Leber aufgenommen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der von uns bestimmten Leberaufnahme-Kinetik<sup>3</sup>. Die von Rensen et al. verwendete Methodik erlaubt auf Grund ihres Aufwandes und der hohen Belastung für den Organismus nur Messwerte an wenigen Zeitpunkten. Eine Kinetik der Leberaufnahme ließ sich somit nicht bestimmen und ist erst durch die sehr viel höhere Zeitauflösung der dynamischen MRT-Bildgebung von SPIO-Nanosomen zugänglich.

Die SPIO-Nanosomen haben nach unseren Messungen in der Maus eine Halbwertszeit im Blut von weniger als zwei Minuten. Diese Halbwertszeit deckt sich mit Daten von Rensen et al. welche nach 2 Minuten noch etwa 40% der injizierten Emulsionen im Blut finden<sup>294</sup>. Auf diese Weise erklärt sich auch warum die Kinetik von postprandialen Lipoproteinen mit radioaktiven Markierungen, welche auf Blutentnahmen angewiesen sind, nicht ausreichend genau bestimmt werden konnte. Hierzu hätte es etwa 5 Blutentnahmen in den ersten zwei Minuten nach der Injektion bedurft, was methodisch kaum möglich ist und eine enorme Belastung für das Versuchstier darstellt. Während Chylomikronen und vergleichbare Lipid-Emulsionen, wie von Redgrave et al. in Ratten gezeigt, eine Halbwertszeit im Plasma von etwa 3 Minuten besitzen<sup>219</sup>, haben solche Lipid-Emulsionen im Menschen eine Halbwertszeit von etwa 10 Minuten im Plasma<sup>218</sup>.

Um zu testen, ob sich auch bereits bekannte Defekte im Stoffwechsel der postprandialen Lipoproteine mit Hilfe der SPIO-Nanosomen abbilden lassen, wurde die Leberaufnahme-Kinetik in Wildtyp, ApoE-defizienten und LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen bestimmt.

Beide Mausmodelle haben eine verlangsamten Plasma-Clearance-Rate von postprandialen Lipoproteinen und vergleichbaren Lipid-Emulsionen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen<sup>294</sup>. Die SPIO-Nanosomen wurden in beiden Mausmodellen langsamer in die Leber aufgenommen als in Wildtyp-Mäusen. Unsere Beobachtungen für die Nanosomen sind somit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rensen et al. für Lipoprotein-ähnliche Emulsionen<sup>294</sup>.

Es konnte also auch *in vivo* mit Hilfe zwei verschiedener Mausmodelle, in einem fehlt der benötigte Ligand und in dem anderen ein Lipoprotein-Rezeptor, gezeigt werden, dass die Nanosomen spezifisch und vergleichbar zu postprandialen Lipoproteinen prozessiert werden. Somit ermöglichen SPIO-Nanosomen die nicht-invasive Visualisierung und Quantifizierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels in zuvor unerreichter Raum- und Zeitauflösung<sup>171,218,294,295</sup>.



## Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass Nanosomen als ein mit Nanokristallen markiertes Chylomikronen-Modell für die Untersuchung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels geeignet sind. Die Vorteile der Nanokristalle gegenüber konventionellen Markierungen liegen in ihren herausragenden physikalischen Eigenschaften, die sie zu optimalen Markierungen machen. Diese Modellpartikel sollen es ermöglichen, den bislang noch nicht in seiner gesamten Komplexität verstandenen Chylomikronen-Stoffwechsel eingehender zu untersuchen.

Die Möglichkeit verschiedene Techniken wie MRT, Fluoreszenz-Mikroskopie und Elektronen-Mikroskopie in einem Experiment zu kombinieren und die Ergebnisse miteinander zu korrelieren, sollte hierbei zu neuen Erkenntnissen führen. SPIO-Nanosomen erlauben mittels MRT die Aufnahme der Lipoproteine in Organe auf der Ebene des gesamten Organismus zu verfolgen. Auf der Organisationsebene der Gewebe kann der Lipoproteinstoffwechsel innerhalb der Zielorgane mit den QD-Nanosomen in der Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert werden. Auf zellulärer Ebene erlauben ultrastrukturelle Untersuchungen in der Elektronenmikroskopie den intrazellulären Lipoproteinstoffwechsel mittels SPIO- und QD-Nanosomen darzustellen.

Die herausragenden physikalischen Eigenschaften der Nanosomen erlauben neben der nicht-invasiven und korrelativen Analyse eine deutlich bessere zeitliche Auflösung in der Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels. In weiterführenden Experimenten in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Carlos Enrich war es sogar möglich, den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel mit QD-Nanosomen in der intravitalem konfokalen Mikroskopie mit einer Aufnahmezeit von weniger als 50 Millisekunden pro Bild in der Leber zu visualisieren. Hierbei konnte erstmalig die Bindung und Aufnahme von postprandialen Lipoproteinen aus dem Blut in die Leberzellen *in vivo* verfolgt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Technik ermöglicht den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel in einem Tier mehrfach zu untersuchen, da die Untersuchung nicht mehr eine Tötung zur Organentnahme erfordert. Daher ist es möglich, Verlaufsstudien durchzuführen, in deren Verlauf die Mäuse eine Insulintoleranz entwickeln. Somit ließe sich der Einfluss der Insulinresistenz auf den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel direkt messen.

Mittels dynamischer MR-Bildgebung und intravitaler Mikroskopie sollte es in der Zukunft auch möglich sein die Wirkung von pharmakologischen Eingriffen in die Prozessierung der Chylomikronen besser zu verstehen. Hierbei wäre es interessant, den Einfluss von Heparin, Tetrahydrolipstatin oder Insulin auf die Kinetik der Leberaufnahme zu untersuchen.

## Literatur

1. Boldt, K., Bruns, O.T., Gaponik, N., & Eychmuller, A. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers. *J. Phys. Chem. B* **110**, 1959-1963 (2006).
2. Tromsdorf, U.I., Bigall, N.C., Kaul, M.G., Bruns, O.T., Nikolic, M.S., Mollwitz, B., Sperling, R.A., Reimer, R., Hohenberg, H., Parak, W.J., Forster, S., Beisiegel, U., Adam, G., & Weller, H. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano Letters* **7**, 2422-2427 (2007).
3. Bruns, O.T., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Lauterwasser, J., Nikolic, M.S., Mollwitz, B., Merkel, M., Bigall, N.C., Sapra, S., Reimer, R., Hohenberg, H., Weller, H., Eychmuller, A., Adam, G., Beisiegel, U., & Heeren, J. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nat Nanotechnol.* **4**, 193-201 (2009).
4. Murray, C.B., Norris, D.J., & Bawendi, M.G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse Cde (e = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 8706-8715 (1993).
5. Wang, X., Zhuang, J., Peng, Q., & Li, Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature* **437**, 121-124 (2005).
6. Lidke, D.S., Nagy, P., Jovin, T.M., & Arndt-Jovin, D.J. Biotin-ligand complexes with streptavidin quantum dots for in vivo cell labeling of membrane receptors. *Methods Mol. Biol.* **374**, 69-79 (2007).
7. Zhang, Q., Li, Y., & Tsien, R.W. The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science* **323**, 1448-1453 (2009).
8. Dahan, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., & Triller, A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**, 442-445 (2003).
9. Courty, S., Bouzigues, C., Luccardini, C., Ehrensperger, M.V., Bonneau, S., & Dahan, M. Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging. *Methods Enzymol.* **414**, 211-228 (2006).
10. Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Cappello, G., & Dahan, M. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano. Lett.* **6**, 1491-1495 (2006).
11. Bouzigues, C., Morel, M., Triller, A., & Dahan, M. Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 11251-11256 (2007).
12. Lidke, D.S., Lidke, K.A., Rieger, B., Jovin, T.M., & Arndt-Jovin, D.J. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J. Cell Biol.* **170**, 619-626 (2005).

13. Lidke,D.S., Nagy,P., Heintzmann,R., Arndt-Jovin,D.J., Post,J.N., Grecco,H.E., Jares-Erijman,E.A., & Jovin,T.M. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat. Biotechnol.* **22**, 198-203 (2004).
14. Cambi,A., Lidke,D.S., Arndt-Jovin,D.J., Figdor,C.G., & Jovin,T.M. Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano Lett.* **7**, 970-977 (2007).
15. Choi,H.S., Liu,W., Misra,P., Tanaka,E., Zimmer,J.P., Itty,I.B., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165-1170 (2007).
16. Liu,W., Howarth,M., Greytak,A.B., Zheng,Y., Nocera,D.G., Ting,A.Y., & Bawendi,M.G. Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1274-1284 (2008).
17. Choi,H.S., Ipe,B.I., Misra,P., Lee,J.H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Tissue- and Organ-Selective Biodistribution of NIR Fluorescent Quantum Dots. *Nano Letters* **0**, (2009).
18. Kim,S.W., Zimmer,J.P., Ohnishi,S., Tracy,J.B., Frangioni,J.V., & Bawendi,M.G. Engineering InAs(x)P(1-x)/InP/ZnSe III-V alloyed core/shell quantum dots for the near-infrared. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10526-10532 (2005).
19. Tanaka,E., Choi,H.S., Fujii,H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 1671-1681 (2006).
20. Parungo,C.P., Ohnishi,S., Kim,S.W., Kim,S., Laurence,R.G., Soltesz,E.G., Chen,F.Y., Colson,Y.L., Cohn,L.H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **129**, 844-850 (2005).
21. Soltesz,E.G., Kim,S., Laurence,R.G., DeGrand,A.M., Parungo,C.P., Dor,D.M., Cohn,L.H., Bawendi,M.G., Frangioni,J.V., & Mihaljevic,T. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann. Thorac. Surg.* **79**, 269-277 (2005).
22. Kim,S., Lim,Y.T., Soltesz,E.G., De Grand,A.M., Lee,J., Nakayama,A., Parker,J.A., Mihaljevic,T., Laurence,R.G., Dor,D.M., Cohn,L.H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol.* **22**, 93-97 (2004).
23. Lim,Y.T., Kim,S., Nakayama,A., Stott,N.E., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol. Imaging* **2**, 50-64 (2003).
24. Soltesz,E.G., Kim,S., Kim,S.W., Laurence,R.G., De Grand,A.M., Parungo,C.P., Cohn,L.H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 386-396 (2006).
25. Parungo,C.P., Colson,Y.L., Kim,S.W., Kim,S., Cohn,L.H., Bawendi,M.G., & Frangioni,J.V. Sentinel lymph node mapping of the pleural space. *Chest* **127**, 1799-1804 (2005).

26. Frangioni, J.V., Kim, S.W., Ohnishi, S., Kim, S., & Bawendi, M.G. Sentinel lymph node mapping with type-II quantum dots. *Methods Mol. Biol.* **374**, 147-159 (2007).
27. Zimmer, J.P., Kim, S.W., Ohnishi, S., Tanaka, E., Frangioni, J.V., & Bawendi, M.G. Size Series of Small Indium Arsenide–Zinc Selenide Core–Shell Nanocrystals and Their Application to In Vivo Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2526-2527 (2006).
28. Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., & Lewis, J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* **152**, 167-173 (1989).
29. Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E.A., & Basilion, J.P. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* **6**, 351-355 (2000).
30. Weissleder, R. & Mahmood, U. Molecular imaging. *Radiology* **219**, 316-333 (2001).
31. Weissleder, R. Molecular imaging in cancer. *Science* **312**, 1168-1171 (2006).
32. Bremer, C., Tung, C.H., & Weissleder, R. In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nat. Med.* **7**, 743-748 (2001).
33. Chen, J., Tung, C.H., Mahmood, U., Ntziachristos, V., Gyurko, R., Fishman, M.C., Huang, P.L., & Weissleder, R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* **105**, 2766-2771 (2002).
34. Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.H., Tang, X.W., Cory, D., Scadden, D.T., & Weissleder, R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 410-414 (2000).
35. Stark, D.D., Weissleder, R., Elizondo, G., Hahn, P.F., Saini, S., Todd, L.E., Wittenberg, J., & Ferrucci, J.T. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* **168**, 297-301 (1988).
36. Weissleder, R. Molecular imaging: exploring the next frontier. *Radiology* **212**, 609-614 (1999).
37. Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Lee, A.S., Josephson, L., & Brady, T.J. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* **175**, 494-498 (1990).
38. Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C.A., Bengel, H.H., & Josephson, L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* **175**, 489-493 (1990).
39. Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., & Weiss, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538-544 (2005).
40. Alivisatos, A.P., Gu, W., & Larabell, C. Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **7**, 55-76 (2005).

41. Parak,W.J., Gerion,D., Pellegrino,T., Zanchet,D., Micheel,C., Williams,S.C., Boudreau,R., Le Gros,M.A., Larabell,C.A., & Alivisatos,A.P. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* **14**, R15-R27 (2003).
42. Lusic,A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
43. World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. 2008. Switzerland, WHO Press.
44. World Health Organization. World health statistics 2009. 2009. WHO Press.
45. Bamba,V. & Rader,D.J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology* **132**, 2181-2190 (2007).
46. Glassberg,H. & Rader,D.J. Management of lipids in the prevention of cardiovascular events. *Annu. Rev. Med.* **59**, 79-94 (2008).
47. Havel,R.J. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 102-109 (1994).
48. Alivisatos,A.P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 13226-13239 (1996).
49. Burda,C., Chen,X.B., Narayanan,R., & El Sayed,M.A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews* **105**, 1025-1102 (2005).
50. Lu,A.H., Salabas,E.L., & Schuth,F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**, 1222-1244 (2007).
51. Vossmeier,T., Katsikas,L., Giersig,M., Popovic,I.G., Diesner,K., Chemseddine,A., Eychmuller,A., & Weller,H. Cds Nanoclusters - Synthesis, Characterization, Size-Dependent Oscillator Strength, Temperature Shift of the Excitonic-Transition Energy, and Reversible Absorbency Shift. *Journal of Physical Chemistry* **98**, 7665-7673 (1994).
52. Harrison,M.T., Kershaw,S.V., Burt,M.G., Rogach,A.L., Kornowski,A., Eychmuller,A., & Weller,H. Colloidal nanocrystals for telecommunications. Complete coverage of the low-loss fiber windows by mercury telluride quantum dots. *Pure and Applied Chemistry* **72**, 295-307 (2000).
53. Rogach,A., Kershaw,S., Burt,M., Harrison,M., Kornowski,A., Eychmuller,A., & Weller,H. Colloidally prepared HgTe nanocrystals with strong room-temperature infrared luminescence. *Advanced Materials* **11**, 552-+ (1999).
54. Rogach,A.L., Katsikas,L., Kornowski,A., Su,D.S., Eychmuller,A., & Weller,H. Synthesis and characterization of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **100**, 1772-1778 (1996).
55. Rogach,A.L., Katsikas,L., Kornowski,A., Su,D., Eychmuller,A., & Weller,H. Synthesis, morphology and optical properties of thiol-stabilized CdTe nanoclusters in aqueous solution. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **101**, 1668-1670 (1997).

56. Spanhel, L., Haase, M., Weller, H., & Henglein, A. Photochemistry of Colloidal Semiconductors .20. Surface Modification and Stability of Strong Luminescing Cds Particles. *Journal of the American Chemical Society* **109**, 5649-5655 (1987).
57. Vossmeier, T., Reck, G., Katsikas, L., Haupt, E.T.K., Schulz, B., & Weller, H. A Double-Diamond Superlattice Built-Up of Cd<sub>17</sub>S<sub>4</sub>(Sch<sub>2</sub>Ch<sub>2</sub>Oh)<sub>(26)</sub> Clusters. *Science* **267**, 1476-1479 (1995).
58. Rogach, A.L., Franzl, T., Klar, T.A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., Shavel, A., Eychmuller, A., Rakovich, Y.P., & Donegan, J.F. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 14628-14637 (2007).
59. Gaponik, N., Talapin, D.V., Rogach, A.L., Hoppe, K., Shevchenko, E.V., Kornowski, A., Eychmuller, A., & Weller, H. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 7177-7185 (2002).
60. Park, J., Lee, E., Hwang, N.M., Kang, M.S., Kim, S.C., Hwang, Y., Park, J.G., Noh, H.J., Kini, J.Y., Park, J.H., & Hyeon, T. One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 2872-2877 (2005).
61. Na, H.B., Song, I.C., & Hyeon, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* **21**, (2009).
62. Park, J., An, K., Hwang, Y., Park, J.G., Noh, H.J., Kim, J.Y., Park, J.H., Hwang, N.M., & Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater.* **3**, 891-895 (2004).
63. Qu, L.H., Peng, Z.A., & Peng, X.G. Alternative routes toward high quality CdSe nanocrystals. *Nano Letters* **1**, 333-337 (2001).
64. Qu, L.H. & Peng, X.G. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 2049-2055 (2002).
65. Talapin, D.V., Mekis, I., Gotzinger, S., Kornowski, A., Benson, O., & Weller, H. CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 18826-18831 (2004).
66. Talapin, D.V., Rogach, A.L., Haase, M., & Weller, H. Evolution of an ensemble of nanoparticles in a colloidal solution: Theoretical study. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 12278-12285 (2001).
67. Talapin, D.V., Haubold, S., Rogach, A.L., Kornowski, A., Haase, M., & Weller, H. A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 2260-2263 (2001).
68. Mekis, I., Talapin, D.V., Kornowski, A., Haase, M., & Weller, H. One-pot synthesis of highly luminescent CdSe/CdS core-shell nanocrystals via organometallic and "greener" chemical approaches. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 7454-7462 (2003).
69. Peng, Z.A. & Peng, X.G. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 183-184 (2001).

70. Katari, J.E.B., Colvin, V.L., & Alivisatos, A.P. X-Ray Photoelectron-Spectroscopy of CdSe Nanocrystals with Applications to Studies of the Nanocrystal Surface. *Journal of Physical Chemistry* **98**, 4109-4117 (1994).
71. Eychmuller, A. Structure and photophysics of semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 6514-6528 (2000).
72. Yin, Y. & Alivisatos, A.P. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature* **437**, 664-670 (2005).
73. Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., & Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials* **4**, 435-446 (2005).
74. Alivisatos, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology* **22**, 47-52 (2004).
75. Yu, W.W., Qu, L.H., Guo, W.Z., & Peng, X.G. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* **15**, 2854-2860 (2003).
76. Redl, F.X., Cho, K.S., Murray, C.B., & O'Brien, S. Three-dimensional binary superlattices of magnetic nanocrystals and semiconductor quantum dots. *Nature* **423**, 968-971 (2003).
77. Larson, D.R., Zipfel, W.R., Williams, R.M., Clark, S.W., Bruchez, M.P., Wise, F.W., & Webb, W.W. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* **300**, 1434-1436 (2003).
78. Peng, X.G., Manna, L., Yang, W.D., Wickham, J., Scher, E., Kadavanich, A., & Alivisatos, A.P. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* **404**, 59-61 (2000).
79. Nirmal, M. & Brus, L. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Accounts of Chemical Research* **32**, 407-414 (1999).
80. Hu, J.T., Odom, T.W., & Lieber, C.M. Chemistry and physics in one dimension: Synthesis and properties of nanowires and nanotubes. *Accounts of Chemical Research* **32**, 435-445 (1999).
81. Collier, C.P., Vossmeier, T., & Heath, J.R. Nanocrystal superlattices. *Annual Review of Physical Chemistry* **49**, 371-404 (1998).
82. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., & Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**, 2013-2016 (1998).
83. Alivisatos, A.P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **271**, 933-937 (1996).
84. Rossetti, R., Nakahara, S., & Brus, L.E. Quantum Size Effects in the Redox Potentials, Resonance Raman-Spectra, and Electronic-Spectra of Cds Crystallites in Aqueous-Solution. *Journal of Chemical Physics* **79**, 1086-1088 (1983).

85. Brus,L.E. A Simple-Model for the Ionization-Potential, Electron-Affinity, and Aqueous Redox Potentials of Small Semiconductor Crystallites. *Journal of Chemical Physics* **79**, 5566-5571 (1983).
86. Pinaud,F., King,D., Moore,H.P., & Weiss,S. Bioactivation and Cell Targeting of Semiconductor CdSe/ZnS Nanocrystals with Phytochelatin-Related Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6115-6123 (2004).
87. Alivisatos,P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotech* **22**, 47-52 (2004).
88. Resch-Genger,U., Grabolle,M., Cavaliere-Jaricot,S., Nitschke,R., & Nann,T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **5**, 763-775 (2008).
89. Giepmans,B.N., Adams,S.R., Ellisman,M.H., & Tsien,R.Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224 (2006).
90. Medintz,I.L., Uyeda,H.T., Goldman,E.R., & Mattoussi,H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **4**, 435-446 (2005).
91. Cormode,D.P., Skajaa,T., van Schooneveld,M.M., Koole,R., Jarzyna,P., Lobatto,M.E., Calcagno,C., Barazza,A., Gordon,R.E., Zanzonico,P., Fisher,E.A., Fayad,Z.A., & Mulder,W.J. Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform. *Nano Lett.* **8**, 3715-3723 (2008).
92. Lauterbur,P.C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **242**, 190-191 (1973).
93. Gillis,P., Moiny,F., & Brooks,R.A. On T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model. *Magn Reson. Med* **47**, 257-263 (2002).
94. Lee,J.H., Huh,Y.M., Jun,Y.w., Seo,J.w., Jang,J.t., Song,H.T., Kim,S., Cho,E.J., Yoon,H.G., Suh,J.S., & Cheon,J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med* **13**, 95-99 (2007).
95. Matsumoto,Y. & Jasanoff,A. T2 relaxation induced by clusters of superparamagnetic nanoparticles: Monte Carlo simulations. *Magn Reson. Imaging* **26**, 994-998 (2008).
96. Bruchez,M., Jr., Moronne,M., Gin,P., Weiss,S., & Alivisatos,A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**, 2013-2016 (1998).
97. Chan,W.C. & Nie,S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* **281**, 2016-2018 (1998).
98. Dubertret,B., Skourides,P., Norris,D.J., Noireaux,V., Brivanlou,A.H., & Libchaber,A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **298**, 1759-1762 (2002).
99. Ballou,B., Lagerholm,B.C., Ernst,L.A., Bruchez,M.P., & Waggoner,A.S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug. Chem.* **15**, 79-86 (2004).



100. Dahan,M., Levi,S., Luccardini,C., Rostaing,P., Riveau,B., & Triller,A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**, 442-445 (2003).
101. Courty,S., Luccardini,C., Bellaiche,Y., Cappello,G., & Dahan,M. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano. Lett.* **6**, 1491-1495 (2006).
102. Bouzigues,C., Morel,M., Triller,A., & Dahan,M. Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 11251-11256 (2007).
103. Cambi,A., Lidke,D.S., Arndt-Jovin,D.J., Figdor,C.G., & Jovin,T.M. Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano. Lett.* **7**, 970-977 (2007).
104. Lidke,D.S., Lidke,K.A., Rieger,B., Jovin,T.M., & Arndt-Jovin,D.J. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J. Cell Biol.* **170**, 619-626 (2005).
105. Lidke,D.S., Nagy,P., Heintzmann,R., Arndt-Jovin,D.J., Post,J.N., Grecco,H.E., Jares-Erijman,E.A., & Jovin,T.M. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat. Biotechnol.* **22**, 198-203 (2004).
106. Medintz,I.L., Clapp,A.R., Mattoussi,H., Goldman,E.R., Fisher,B., & Mauro,J.M. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater.* **2**, 630-638 (2003).
107. So,M.K., Xu,C., Loening,A.M., Gambhir,S.S., & Rao,J. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **24**, 339-343 (2006).
108. Chattopadhyay,P.K., Price,D.A., Harper,T.F., Betts,M.R., Yu,J., Gostick,E., Perfetto,S.P., Goepfert,P., Koup,R.A., De Rosa,S.C., Bruchez,M.P., & Roederer,M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat. Med.* **12**, 972-977 (2006).
109. Derfus,A.M., Chan,W.C.W., & Bhatia,S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* **4**, 11-18 (2004).
110. Kirchner,C., Liedl,T., Kudera,S., Pellegrino,T., Munoz,J.A., Gaub,H.E., Stolzle,S., Fertig,N., & Parak,W.J. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 331-338 (2005).
111. Douma,K., Prinzen,L., Slaaf,D.W., Reutelingsperger,C.P., Biessen,E.A., Hackeng,T.M., Post,M.J., & van Zandvoort,M.A. Nanoparticles for optical molecular imaging of atherosclerosis. *Small* **5**, 544-557 (2009).
112. Saini,S., Stark,D.D., Hahn,P.F., Wittenberg,J., Brady,T.J., & Ferrucci,J.T. Ferrite Particles - A Superparamagnetic Mr Contrast Agent for the Reticuloendothelial System. *Radiology* **162**, 211-216 (1987).

113. Harisinghani, M.G., Barentsz, J., Hahn, P.F., Deserno, W.M., Tabatabaei, S., van de Kaa, C.H., de la, R.J., & Weissleder, R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2491-2499 (2003).
114. Ruehm, S.G., Corot, C., Vogt, P., Kolb, S., & Debatin, J.F. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **103**, 415-422 (2001).
115. Kooi, M.E., Cappendijk, V.C., Cleutjens, K.B., Kessels, A.G., Kitslaar, P.J., Borgers, M., Frederik, P.M., Daemen, M.J., & van Engelshoven, J.M. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* **107**, 2453-2458 (2003).
116. Kircher, M.F., Allport, J.R., Graves, E.E., Love, V., Josephson, L., Lichtman, A.H., & Weissleder, R. In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res.* **63**, 6838-6846 (2003).
117. Shapiro, E.M., Skrtic, S., Sharer, K., Hill, J.M., Dunbar, C.E., & Koretsky, A.P. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10901-10906 (2004).
118. Shapiro, E.M., Medford-Davis, L.N., Fahmy, T.M., Dunbar, C.E., & Koretsky, A.P. Antibody-mediated cell labeling of peripheral T cells with micron-sized iron oxide particles (MPIOs) allows single cell detection by MRI. *Contrast. Media Mol. Imaging* **2**, 147-153 (2007).
119. Hinds, K.A., Hill, J.M., Shapiro, E.M., Laukkanen, M.O., Silva, A.C., Combs, C.A., Varney, T.R., Balaban, R.S., Koretsky, A.P., & Dunbar, C.E. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* **102**, 867-872 (2003).
120. Weissleder, R., Reimer, P., Lee, A.S., Wittenberg, J., & Brady, T.J. MR receptor imaging: ultrasmall iron oxide particles targeted to asialoglycoprotein receptors. *AJR Am. J. Roentgenol.* **155**, 1161-1167 (1990).
121. Reimer, P., Weissleder, R., Lee, A.S., Wittenberg, J., & Brady, T.J. Receptor imaging: application to MR imaging of liver cancer. *Radiology* **177**, 729-734 (1990).
122. Reimer, P., Weissleder, R., Lee, A.S., Buettner, S., Wittenberg, J., & Brady, T.J. Asialoglycoprotein receptor function in benign liver disease: evaluation with MR imaging. *Radiology* **178**, 769-774 (1991).
123. Ichikawa, T., Hogemann, D., Saeki, Y., Tyminski, E., Terada, K., Weissleder, R., Chiocca, E.A., & Basilion, J.P. MRI of transgene expression: correlation to therapeutic gene expression. *Neoplasia*. **4**, 523-530 (2002).
124. Choi, H., Choi, S.R., Zhou, R., Kung, H.F., & Chen, I.W. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Acad. Radiol.* **11**, 996-1004 (2004).
125. Artemov, D., Mori, N., Okollie, B., & Bhujwala, Z.M. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles. *Magn Reson. Med.* **49**, 403-408 (2003).

126. Huh, Y.M., Jun, Y.W., Song, H.T., Kim, S., Choi, J.S., Lee, J.H., Yoon, S., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S., & Cheon, J. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12387-12391 (2005).
127. Josephson, L., Perez, J.M., & Weissleder, R. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences. *Angewandte Chemie-International Edition* **40**, 3204-+ (2001).
128. Perez, J.M., Josephson, L., O'Loughlin, T., Hogemann, D., & Weissleder, R. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nat. Biotechnol.* **20**, 816-820 (2002).
129. Perez, J.M., O'Loughlin, T., Simeone, F.J., Weissleder, R., & Josephson, L. DNA-based magnetic nanoparticle assembly acts as a magnetic relaxation nanoswitch allowing screening of DNA-cleaving agents. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2856-2857 (2002).
130. Perez, J.M., Simeone, F.J., Saeki, Y., Josephson, L., & Weissleder, R. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10192-10193 (2003).
131. Perez, J.M., Josephson, L., & Weissleder, R. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *Chembiochem.* **5**, 261-264 (2004).
132. Perez, J.M., Josephson, L., & Weissleder, R. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *Chembiochem.* **5**, 261-264 (2004).
133. Grimm, J., Perez, J.M., Josephson, L., & Weissleder, R. Novel nanosensors for rapid analysis of telomerase activity. *Cancer Res.* **64**, 639-643 (2004).
134. Perez, J.M., Grimm, J., Josephson, L., & Weissleder, R. Integrated nanosensors to determine levels and functional activity of human telomerase. *Neoplasia.* **10**, 1066-1072 (2008).
135. Groc, L., Lafourcade, M., Heine, M., Renner, M., Racine, V., Sibarita, J.B., Lounis, B., Choquet, D., & Cognet, L. Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J. Neurosci.* **27**, 12433-12437 (2007).
136. Tekle, C., Deurs, B., Sandvig, K., & Iversen, T.G. Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands. *Nano Lett.* **8**, 1858-1865 (2008).
137. Havel, R.J. & Kane, J.P. in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Edn. 8. eds. Scriver, C., Beaudet, A., Valle, D., Sly, W.S., Childs, B., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B. 2705-2716 (McGraw-Hill, New York; 2001).
138. Kostner, G.M., Scharnagl, H., Kostner, K., & März, W. in *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, Edn. 3. eds. Schwandt, P. & Parhofer, K.G. 2-65 (Schattauer, Stuttgart; 2007).
139. Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., & von Eckardstein, A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **161**, 1-16 (2002).

140. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
141. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 897-930 (1977).
142. Goldstein, J.L., Dana, S.E., Brunschede, G.Y., & Brown, M.S. Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**, 1092-1096 (1975).
143. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **249**, 5153-5162 (1974).
144. May, P. & Herz, J. LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic*. **4**, 291-301 (2003).
145. Willnow, T.E., Hammes, A., & Eaton, S. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development* **134**, 3239-3249 (2007).
146. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., & Stanley, K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
147. Herz, J. & Strickland, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest* **108**, 779-784 (2001).
148. von Eckardstein, A., Nofer, J.R., & Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 13-27 (2001).
149. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J., Jr., & Hayden, M.R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **22**, 336-345 (1999).
150. Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., & Oram, J.F. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest* **104**, R25-R31 (1999).
151. Ragozin, S., Niemeier, A., Laatsch, A., Loeffler, B., Merkel, M., Beisiegel, U., & Heeren, J. Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1433-1438 (2005).
152. Young, S.G. & Fielding, C.J. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* **22**, 316-318 (1999).
153. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P., & Assmann, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **22**, 352-355 (1999).

154. Bodzioch,M., Orso,E., Klucken,J., Langmann,T., Bottcher,A., Diederich,W., Drobnik,W., Barlage,S., Buchler,C., Porsch-Ozcurumez,M., Kaminski,W.E., Hahmann,H.W., Oette,K., Rothe,G., Aslanidis,C., Lackner,K.J., & Schmitz,G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **22**, 347-351 (1999).
155. Tall,A.R. Plasma lipid transfer proteins. *J. Lipid Res.* **27**, 361-367 (1986).
156. Patsch,J.R. & Beisiegel,U. in Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Edn. 3. eds. Schwandt,P. & Parhofer,K.G. 156-185 (Schattauer, Stuttgart; 2007).
157. Hamosh,M., Klaeveman,H.L., Wolf,R.O., & Scow,R.O. Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man. *J. Clin. Invest* **55**, 908-913 (1975).
158. Lairon,D., Nalbone,G., Lafont,H., Leonardi,J., Domingo,N., Hauton,J.C., & Verger,R. Possible roles of bile lipids and colipase in lipase adsorption. *Biochemistry* **17**, 5263-5269 (1978).
159. Gordon,D.A. Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein B lipoprotein assembly. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**, 131-137 (1997).
160. Cooper,A.D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* **38**, 2173-2192 (1997).
161. Nestel,P.J. Relationship between plasma triglycerides and removal of chylomicrons. *J. Clin. Invest* **43**, 943-949 (1964).
162. Patsch,J.R., Karlin,J.B., Scott,L.W., Smith,L.C., & Gotto,A.M., Jr. Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 1449-1453 (1983).
163. Patsch,J.R., Miesenbock,G., Hopferwieser,T., Muhlberger,V., Knapp,E., Dunn,J.K., Gotto,A.M., Jr., & Patsch,W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 1336-1345 (1992).
164. Imaizumi,K., Havel,R.J., Fainaru,M., & Vigne,J.L. Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats. *J. Lipid Res.* **19**, 1038-1046 (1978).
165. Heeren,J., Niemeier,A., Merkel,M., & Beisiegel,U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med* **80**, 576-584 (2002).
166. Zheng,C., Murdoch,S.J., Brunzell,J.D., & Sacks,F.M. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 891-896 (2006).
167. Mead,J.R., Irvine,S.A., & Ramji,D.P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med* **80**, 753-769 (2002).
168. Merkel,M., Eckel,R.H., & Goldberg,I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* **43**, 1997-2006 (2002).

169. Beigneux,A.P., Davies,B.S., Gin,P., Weinstein,M.M., Farber,E., Qiao,X., Peale,F., Bunting,S., Walzem,R.L., Wong,J.S., Blaner,W.S., Ding,Z.M., Melford,K., Wongsiriroj,N., Shu,X., de Sauvage,F., Ryan,R.O., Fong,L.G., Bensadoun,A., & Young,S.G. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* **5**, 279-291 (2007).
170. Gin,P., Yin,L., Davies,B.S., Weinstein,M.M., Ryan,R.O., Bensadoun,A., Fong,L.G., Young,S.G., & Beigneux,A.P. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J. Biol. Chem.* **283**, 29554-29562 (2008).
171. Merkel,M., Loeffler,B., Kluger,M., Fabig,N., Geppert,G., Pennacchio,L.A., Laatsch,A., & Heeren,J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 21553-21560 (2005).
172. Olivecrona,G. & Beisiegel,U. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1545-1549 (1997).
173. Lagrost,L., Desrumaux,C., Masson,D., Deckert,V., & Gambert,P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **9**, 203-209 (1998).
174. Zambon,A., Schmidt,I., Beisiegel,U., & Brunzell,J.D. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* **37**, 2394-2404 (1996).
175. Beisiegel,U., Weber,W., & Bengtsson-Olivecrona,G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 8342-8346 (1991).
176. Beisiegel,U. & Heeren,J. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc. Nutr. Soc.* **56**, 731-737 (1997).
177. Merkel,M., Kako,Y., Radner,H., Cho,I.S., Ramasamy,R., Brunzell,J.D., Goldberg,I.J., & Breslow,J.L. Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 13841-13846 (1998).
178. Merkel,M., Heeren,J., Dudeck,W., Rinninger,F., Radner,H., Breslow,J.L., Goldberg,I.J., Zechner,R., & Greten,H. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* **277**, 7405-7411 (2002).
179. Mahley,R.W. & Ji,Z.S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research* **40**, 1-16 (1999).
180. Hussain,M.M., Mahley,R.W., Boyles,J.K., Lindquist,P.A., Brecht,W.J., & Innerarity,T.L. Chylomicron Metabolism - Chylomicron Uptake by Bone-Marrow in Different Animal Species. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 17931-17938 (1989).

181. Niemeier,A., Kassem,M., Toedter,K., Wendt,D., Ruether,W., Beisiegel,U., & Heeren,J. Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 283-293 (2005).
182. Zhang,S.H., Reddick,R.L., Piedrahita,J.A., & Maeda,N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein-e. *Science* **258**, 468-471 (1992).
183. Plump,A.S., Smith,J.D., Hayek,T., Aaltosetala,K., Walsh,A., Verstuyft,J.G., Rubin,E.M., & Breslow,J.L. Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in Es Cells. *Cell* **71**, 343-353 (1992).
184. Ishibashi,S., Herz,J., Maeda,N., Goldstein,J.L., & Brown,M.S. The 2-Receptor Model of Lipoprotein Clearance - Tests of the Hypothesis in Knockout Mice Lacking the Low-Density-Lipoprotein Receptor, Apolipoprotein-E, Or Both Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4431-4435 (1994).
185. Ishibashi,S., Perrey,S., Chen,Z., Osuga,J., Shimada,M., Ohashi,K., Harada,K., Yazaki,Y., & Yamada,N. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J. Biol. Chem.* **271**, 22422-22427 (1996).
186. Beisiegel,U. New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **124**, 1-8 (1996).
187. Verges,M., Bensadoun,A., Herz,J., Belcher,J.D., & Havel,R.J. Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 9030-9036 (2004).
188. Ji,Z.S., Lauer,S.J., Fazio,S., Bensadoun,A., Taylor,J.M., & Mahley,R.W. Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* **269**, 13429-13436 (1994).
189. Mulder,M., Lombardi,P., Jansen,H., van Berkel,T.J., Frants,R.R., & Havekes,L.M. Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 9369-9375 (1993).
190. Shafi,S., Brady,S.E., Bensadoun,A., & Havel,R.J. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J. Lipid Res.* **35**, 709-720 (1994).
191. Zambon,A., Deeb,S.S., Bensadoun,A., Foster,K.E., & Brunzell,J.D. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J. Lipid Res.* **41**, 2094-2099 (2000).
192. Choi,S.Y., Fong,L.G., Kirven,M.J., & Cooper,A.D. Use of an anti-low density lipoprotein receptor antibody to quantify the role of the LDL receptor in the removal of chylomicron remnants in the mouse in vivo. *J. Clin. Invest* **88**, 1173-1181 (1991).
193. Choi,S.Y. & Cooper,A.D. A comparison of the roles of the low density lipoprotein (LDL) receptor and the LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in chylomicron remnant removal in the mouse in vivo. *J. Biol. Chem.* **268**, 15804-15811 (1993).

194. de Faria,E., Fong,L.G., Komaromy,M., & Cooper,A.D. Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J. Lipid Res.* **37**, 197-209 (1996).
195. Krapp,A., Ahle,S., Kersting,S., Hua,Y., Kneser,K., Nielsen,M., Gliemann,J., & Beisiegel,U. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J. Lipid Res.* **37**, 926-936 (1996).
196. Mahley,R.W. & Huang,Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J. Clin. Invest* **117**, 94-98 (2007).
197. MacArthur,J.M., Bishop,J.R., Stanford,K.I., Wang,L., Bensadoun,A., Witztum,J.L., & Esko,J.D. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J. Clin. Invest* **117**, 153-164 (2007).
198. Rohlmann,A., Gotthardt,M., Hammer,R.E., & Herz,J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest* **101**, 689-695 (1998).
199. Bishop,J.R., Schuksz,M., & Esko,J.D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-1037 (2007).
200. Lombardi,P., Mulder,M., van der,B.H., Frants,R.R., & Havekes,L.M. Inefficient degradation of triglyceride-rich lipoprotein by HepG2 cells is due to a retarded transport to the lysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **268**, 26113-26119 (1993).
201. Tabas,I., Lim,S., Xu,X.X., & Maxfield,F.R. Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* **111**, 929-940 (1990).
202. Mukherjee,S., Ghosh,R.N., & Maxfield,F.R. Endocytosis. *Physiol Rev.* **77**, 759-803 (1997).
203. Heeren,J. & Beisiegel,U. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 255-260 (2001).
204. Heeren,J., Weber,W., & Beisiegel,U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* **112** ( Pt 3), 349-359 (1999).
205. Heeren,J., Grewal,T., Laatsch,A., Rottke,D., Rinninger,F., Enrich,C., & Beisiegel,U. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 14370-14378 (2003).
206. Heeren,J., Grewal,T., Jackle,S., & Beisiegel,U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 42333-42338 (2001).
207. Rensen,P.C., Jong,M.C., van Vark,L.C., van der,B.H., Hendriks,W.L., van Berkel,T.J., Biessen,E.A., & Havekes,L.M. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 8564-8571 (2000).



208. Packard,C.J., Third,J.L., Shepherd,J., Lorimer,A.R., Morgan,H.G., & Lawrie,T.D. Low density lipoprotein metabolism in a family of familial hypercholesterolemic patients. *Metabolism* **25**, 995-1006 (1976).
209. Eisenberg,S., Windmueller,H.G., & Levy,R.I. Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J. Lipid Res.* **14**, 446-458 (1973).
210. Karpe,F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **246**, 341-355 (1999).
211. Magkos,F. & Sidossis,L.S. Measuring very low density lipoprotein-triglyceride kinetics in man in vivo: how different the various methods really are. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **7**, 547-555 (2004).
212. Zech,L.A., Grundy,S.M., Steinberg,D., & Berman,M. Kinetic model for production and metabolism of very low density lipoprotein triglycerides. Evidence for a slow production pathway and results for normolipidemic subjects. *J. Clin. Invest* **63**, 1262-1273 (1979).
213. Grundy,S.M., Mok,H.Y., Zech,L., Steinberg,D., & Berman,M. Transport of very low density lipoprotein triglycerides in varying degrees of obesity and hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest* **63**, 1274-1283 (1979).
214. Lichtenstein,A.H., Hachey,D.L., Millar,J.S., Jenner,J.L., Booth,L., Ordovas,J., & Schaefer,E.J. Measurement of human apolipoprotein B-48 and B-100 kinetics in triglyceride-rich lipoproteins using [5,5,5-2H<sub>3</sub>]leucine. *J. Lipid Res.* **33**, 907-914 (1992).
215. Martins,I.J. & Redgrave,T.G. A <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> breath test to assess the metabolism of triglyceride-rich lipoprotein remnants in mice. *J. Lipid Res.* **39**, 691-698 (1998).
216. Redgrave,T.G., Martins,I.J., & Mortimer,B.-C. Measurement of expired carbon dioxide to assess the metabolism of remnant lipoproteins. *J. Lipid Res.* **36**, 2670-2675 (1995).
217. Watts,G.F., Barrett,P.H., Marais,A.D., Dane-Stewart,C.A., Martins,I.J., Dimmitt,S.B., & Redgrave,T.G. Chylomicron remnant metabolism in familial hypercholesterolaemia studied with a stable isotope breath test. *Atherosclerosis* **157**, 519-523 (2001).
218. Redgrave,T.G., Ly,H.L., Quintao,E.C., Ramberg,C.F., & Boston,R.C. Clearance from plasma of triacylglycerol and cholesteryl ester after intravenous injection of chylomicron-like lipid emulsions in rats and man. *Biochem. J.* **290** ( Pt 3), 843-847 (1993).
219. Redgrave,T.G. & Maranhao,R.C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **835**, 104-112 (1985).
220. Merkel,M., Kako,Y.S., Radner,H., Cho,I.S., Brunzell,J.D., Goldberg,I.J., & Breslow,J.L. Transgenic mice expressing catalytically inactive LPL in muscle have increased muscle uptake of VLDL particles. *Circulation* **98**, 591 (1998).
221. Laatsch,A., Merkel,M., Talmud,P.J., Grewal,T., Beisiegel,U., & Heeren,J. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* (2008).

# Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers

*Klaus Boldt<sup>#</sup>, Oliver Bruns<sup>§</sup>, Nikolai Gaponik<sup>‡</sup>, and Alexander Eychmüller<sup>‡\*</sup>*

<sup>#</sup>Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg,  
Germany

<sup>§</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology II: Molecular Cell Biology, University Medical  
Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>‡</sup>Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, TU Dresden, Bergstraße 66b, 01062 Dresden,  
Germany

\*e-mail: alexander.eychmueller@chemie.tu-dresden.de

**RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required  
according to the journal that you are submitting your paper to)**

ABSTRACT: Due to their greater photostability compared to established organic fluorescence markers semiconductor quantum dots provide an attractive alternative for the biolabelling of living cells. Based on a comparative investigation using differently sized thiol-stabilized CdTe nanocrystals in a variety of commonly used biological buffers a method is developed to quantify the stability of such a multicomponent system. Above a certain critical size the intensity of the photoluminescence of the nanocrystals is found to diminish with pseudo zero-order kinetics whereas for specific combinations of particle size, ligand and buffer there appears to be no decay below this critical particle size pointing out the necessity for thorough investigations of this kind in the view of prospect applications of semiconductor nanocrystals in the area of biolabelling.

## Introduction

Due to their tuneable luminescence wavelength and high photostability compared to organic dyes II-VI semiconductor quantum dots (QDs)<sup>1</sup> are attractive candidates for fluorescence markers in biolabelling. They are small enough to be incorporated by cells and even seem to be transferred into cells on their own just by adding a solution of QDs. Due to the size quantisation effect only one material is necessary to mark different proteins or cell compartments simply by employing different size fractions of one particle synthesis.

Apart from the organometallic synthesis of II-VI semiconductor QDs based on the thermolysis of precursors in highly coordinating, non-polar solvents ( trioctylphosphine/trioctylphosphineoxide, TOP/TOPO) a synthetic route using water as a solvent and thiols as ligands has been established<sup>2</sup>. QDs prepared by this method incorporate the sulphur of the thiol groups as part of their crystalline structure. When using Se or Te as the chalcogenide, one can speak of a core/shell NC containing a metal sulphide shell<sup>3</sup>. To keep the particles in solution the ligands have polar moieties such as carboxylic groups. This facilitates the interest in such QDs for biological applications as they are water-soluble as formed and can be transferred into living cells without prior ligand exchange. Furthermore these groups may be functionalized by coupling with proteins for labelling. Successful conjugation of semiconductor QDs to proteins like bovine serum albumin (BSA) and IgG has already been reported<sup>4,5</sup>. In order to use QDs for labelling in a living organism, knowledge of how the particle's luminescence depends on the concentration, pH value, concentration of salts in solution and time is essential. Since CdTe-QDs may slowly release the toxic Cd<sup>2+</sup> and Te<sup>2-</sup> ions into the solution, the particles must be as inert as possible for any *in vitro* application. As Parak *et al.* have shown<sup>6,7</sup>, the toxicity of CdTe-QDs not only depends on the concentration of free Cd<sup>2+</sup> ions but also on whether the particles are ingested by a cell and where they are stored. The release of Cd<sup>2+</sup> from the particles' surface can be reduced by employing core/shell particles of coating of the particles with silica or a polymer.

Also the photoluminescence (PL) of the QD must not be influenced by desorption of the ligands, destruction of the NC or creation of traps for radiationless recombination of an excited electron/hole pair.

In this work buffers commonly used for the indirect immunofluorescence labelling of cells were tested<sup>8</sup>. In order to do so several fractions of the size-selective precipitation of thioglycolic acid (TGA) and mercaptopropionic acid (MPA) stabilized particles were mixed with different buffers of a defined concentration. The particle PL decay was observed over a week time by emission spectroscopy.

## Experimental Section

**Synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals<sup>2</sup>:** 3.06 mmol of the stabilizer and 0.985 g (2.35 mmol)  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  was dissolved in 125 mL deionized water. The pH was adjusted to a value of 12 using a 1 M solution of NaOH. The solution was stirred and deaerated by bubbling nitrogen through it for 30 minutes. Under stirring,  $\text{H}_2\text{Te}$  gas generated by adding 10 mL of 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to 0.2 g (0.46 mmol)  $\text{Al}_2\text{Te}_3$ , was passed through the solution with a slow stream of nitrogen. Depending on the stabilizer a red or orange solution of CdTe precursors was formed. Afterwards the solution was refluxed under open-air conditions for several hours, until the particles had grown to the desired size. The progress of the reaction was followed by absorption spectroscopy.

**Size-selective precipitation of CdTe-QDs:** The colloidal solution of CdTe-QDs was evaporated until the first particles precipitated. 500  $\mu\text{L}$  of 2-propanol were then added to the solution. The resulting precipitate was removed by centrifugation for 5 minutes at 4500 rpm and redissolved in water. The procedure was repeated with a stepwise increase of the amount of 2-propanol until most of the CdTe was precipitated.

**Chemicals and Methods:** Milli-Q water (Millipore) was used as bidistilled water. All chemicals were purchased from Merck and used as received. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X) liquid (low glucose) containing 1,000 mg/L D-glucose, L-glutamine and 110 mg/L sodium pyruvate from Invitrogen was used as the cell medium

For analysis of the QDs a Cary 100 absorption spectrometer (Varian) and a Fluoro-Log emission spectrometer (Instruments SA) were employed. The wellplates for the stability assay were measured with a Cary Eclipse emission spectrometer (Varian).

## Results and Discussion

To quantify the stability of the CdTe-QDs in aqueous buffers, all variables must be collected and a method must be found with which the variation of all pertinent variables can easily be measured without changing the measurement. Independent variables in a system containing nanoparticles and a buffer are: the type of the QDs, the ligands, the size of the QDs, concentration of the QDs, type of buffer, concentration of buffer, pH value and time. Dependent variables are: the intensity of the PL, the full width at half maximum of the emission signal and the wavelength at the emission maximum. In this

work the particle size, the type of ligands and buffer were varied and the dependent variables were measured over a time span of five days. The particles employed were CdTe QDs with TGA or MPA as ligands after application of size selective precipitation.

To obtain a comparable signal the amount of particles which were added to 100  $\mu\text{L}$  of buffer was calculated to result in an optical density (OD) of 0.2 at the first absorption maximum. A varying concentration of QDs was accepted in favour of a constant OD although a lower concentration of QDs results in a diffusion of ligands from the particle surface and therefore a decreased stability<sup>3</sup>. In a living cell it is desirable to maintain the concentration of CdTe as low as possible without a decrease of the particles' stability. The parameters are therefore similar to the parameters that were expected in biolabelling.

The measurement of a full wellplate took twenty minutes, which is the limiting factor in the determination of the accuracy of the time. On the day the buffers were added to the QDs the wellplates were measured three times: immediately after the experiment was started, and again after two and five hours. After that the luminescence was measured every 24 hours.

The particle size was determined from the first absorption maximum using an empirical formula derived for particles synthesized via an organometallic route by *Peng et al.*<sup>9</sup>:

$$D = (9.8127 \times 10^{-7}) \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \lambda^2 + (1.0064) \lambda - (194.84)$$

where  $D$  is the diameter of the particles and  $\lambda$  the wavelength of the first electronic transition.

The buffers were chosen to represent a wide spectrum of the pH scale between 5.0 and 11.0, and to test the most frequently used biochemical buffers (figure 1). For extreme pH values buffers sold by Merck were used instead of biochemical buffers: A citrate/NaOH buffer for pH 5.0 and  $\text{B}(\text{OH})_3/\text{KCl}/\text{NaOH}$  buffers for pH 9.0 and 11.0. The buffers were systematically tested for the application of indirect immunofluorescence labelling with CdTe nanocrystals. In such an experiment cells are fixed with 4 % Paraformaldehyde (PFA) in PBS for 30 minutes. Their membranes are made permeable using PBS/glycine/saponine for 30 minutes at 37° C after which free binding spaces are blocked using BSA for 30 minutes. After each step the cells are washed with PBS. The fluorescence marker, linked covalently to a specific antibody, is then transferred into the cells over a period of 45 minutes after which the cells are placed under a microscope where the location of the marker shows the location of

the specific antigen. Often a secondary antibody that binds to an antigen-specific primary antibody is used, because this strategy simplifies the experiment by requiring only one type of marker-linked antibody. Other buffers tested were cell medium, MES (Morpholinethansulfonic acid) and a TRIS-buffer (Tris(2-hydroxyethyl)-amine, pH 8.0, 200 mM).

Usually, organic markers have very little photostability and bleach in the order of minutes under illumination. Semiconductor QDs are more robust and show longer durability which makes them an interesting alternative<sup>10</sup>.

Large semiconductor QDs have a greater resistance to photobleaching than smaller ones. Regarding the stability towards their chemical environment the reverse tendency was observed. The smaller the QDs the more stable they are in acidic conditions and low buffer concentrations. In acidic citrate/NaOH buffer (pH 5.0) the fluorescence of red TGA-capped QDs drops down to 5 % of the original PL after a few minutes while for the green and blue species the intensity remaining was about 25 %. The reason for this behaviour could be the cluster-like, more defined structure of very small nanocrystals<sup>11-14</sup>. The surface structure of very small particles and hence the occurrence of charge carrier traps strongly depends on the size and the symmetry of the nanoobjects.

The TGA 6 fraction for example remains stable in PBS for one week while the emission of fraction TGA 1 decreases notably over the same time span (figure 2). These results can be applied to other buffers. Figure 3 shows the observed temporal evolution of the relative intensity maxima of the TGA-capped fractions in PBS. The maximum at 0 hours after adding the buffers was set to 100 %. For the larger nanocrystals a decrease in intensity over time is evident. The tendency to degrade diminishes with decreasing particle size, until the size has reached 3.06 nm beyond which no further changes in intensity are observed. This behaviour can also be seen in most of the other buffers. The slope of the intensity change with time,  $\partial I/\partial t$  (cf. figure 4), and the critical size,  $D_k$  below which no change in intensity can be determined, depend on the buffer and – in case of the slope – on the particle size. With these two values, namely  $\partial I/\partial t$  which is proportional to the particles' rate of decay, and the critical size  $D_k$  a means to characterize a specific particle/buffer mixture is found.

The slope (figure 4) is linear in buffers which do not aggressively destroy the QDs. This is not trivial since one could expect more complex kinetics for this reaction, which includes desorption of ligands from the particle surface, dissolving or aggregation of QDs, and adsorption of other molecules. Table 2 summarizes the experimental results including  $\partial I/\partial t$ ,  $D_k$  and  $\Delta\lambda$ , the observed red shift of the emission (see below) in all the buffers used in this study.

To derive a model for a reaction of pseudo-zero order strongly bound ligands on the particle surface are assumed. Desorption is slow and adsorption practically does not occur, since the concentration of free ligands in solution is very low. On the contrary the concentrations of buffer ions are high, namely between 50 mM and 1M. Adsorption and desorption of ions at the surface are fast processes due to the weak, unspecific bonding between ions and QDs. This results in a constant, low concentration of free coordination places at the surface. Quenching of the QD luminescence can be an effect of oxidation by dissolved oxygen. The multiplate was kept under open-air conditions, resulting in a concentration of oxygen in solution which is also assumed to be constant. Following this explanation the kinetics do not depend on any concentration that was varied in the experiment.

Indeed the kinetics appear to be more complex in the first hours after addition of the buffers. But since the slope is constant over several days it can be used to quantify the stability.

*Peng et al.* have proposed zero-order kinetics to explain the photocatalytic oxidation of thiols to disulfides on the surface of CdSe with regard to the concentration of free thiols in solution<sup>15</sup>. They proposed three processes contributing to the decay of the QDs: photocatalytic oxidation of the ligands, photocatalytic oxidation of the CdSe core and precipitation of the QDs. Water-insoluble disulfides which might be made up from MPA will form micelle-like structures around a nanocrystal until the core has shrunk to the point that it can no longer stabilize the micelle. After a micelle has broken down or when the disulfides are soluble in water, CdTe will precipitate. In contrary to Peng's results especially the small particles seem to be stable towards oxidation. Keeping the samples in the dark also leads to the conclusion that photooxidation is not necessarily taken into account. Figure 5 summarizes the processes taking place in the degradation mechanism of semiconductor QDs in liquid environments.

It is noted that in alkaline buffers the intensity seems to increase over the first five hours. A dependency of the PL-quantum yield (QY) on the pH value is known from the literature<sup>2,16,17</sup>. The highest PL-QY was reported to occur at pH 4.5, which could not be reproduced using the above parameters. At least in alkaline borate buffers the difference in the slope seems to be not or only slightly dependant on the pH value. *Henglein et al.* reported on an "activation" of the luminescence of CdS nanocrystals at pH 10.0 and an excess of free Cd<sup>2+</sup> ions, probably by passivation of the surface by cadmium hydroxide<sup>18</sup>. Here, borate was used, in the form of Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, to set the pH value. This results in conditions which are comparable to the above mentioned parameters.

Until now the derived values that characterize the particles' stability ignore the wavelength of the emission maximum. In several buffers profound red- and blue shifts were observed. Since photometric measurement at a constant wavelength can be disturbed by this, the red shift  $\Delta\lambda$  must be regarded as a third characteristic value to describe the stability of QDs in a buffer.

The blue shift ( $\Delta\lambda < 0$ ) can be the result of a partial destruction of the nanocrystal when ions are removed from the surface. In this case an increase of the concentration of toxic  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Te}^{2-}$  ions has to be taken into account for applications involving living cells. This explanation is supported by the fact that a blue shift is registered when particles are diluted with distilled water. This phenomenon has already been described earlier<sup>3</sup>. A blue shift was also measured when proteins were present in the solution (2 % BSA in PBS/glycine/saponine). Both cadmium and tellurium ions are known to react with disulfide bridges in proteins.

Two models may be used to explain the red shift: First it is possible that the particles agglomerate due to the loss of stabilizers. In this case CdTe bulk material will precipitate and a decrease of the PL intensity, scattering and a larger full width half maximum should be observed. The second possibility is the occurrence of Ostwald ripening. This process requires the surface of the QDs to be dynamic and will be strongly dependant on the temperature.

When using MPA instead of TGA as ligands the results were similar, although slightly larger particles were used in case of MPA as the stabilizer: buffers that adversely effect TGA-capped QDs also decrease the PL intensity of MPA-capped particles. Conversely buffers that stabilize TGA-capped QDs also stabilize MPA-capped ones. As with TGA as a ligand MES, PFA, MOWIOL and cell medium also result in a large red shift. Only with MPA-capped particles do the alkaline borate buffers seem to be less stabilizing than PBS and TRIS buffer.

## **Summary and Outlook**

The results demonstrate the possibility of the use of water-soluble, thiol-capped QDs for immunofluorescence labelling employing the commonly used buffers. The nanocrystals endure both frequently-used buffers PBS and TRIS. High pH values and moderate buffer concentrations stabilize the QDs, while acidic media and high dilution extinguishes the PL completely. Even under neutral conditions the particles keep their photoluminescence for days. The only problematic solutions found are aggressive substances such as PFA and the cell medium, the latter being a mixture of so many substances that the reason for the instability of the particles cannot be easily determined.

Measurement with a varying concentration of free ligands to verify the assumptions made to explain the kinetics are in progress. As higher concentrations of free ligands should result in a higher stability of the nanocrystals experiments are in progress to verify the assumptions made above in order to explain the

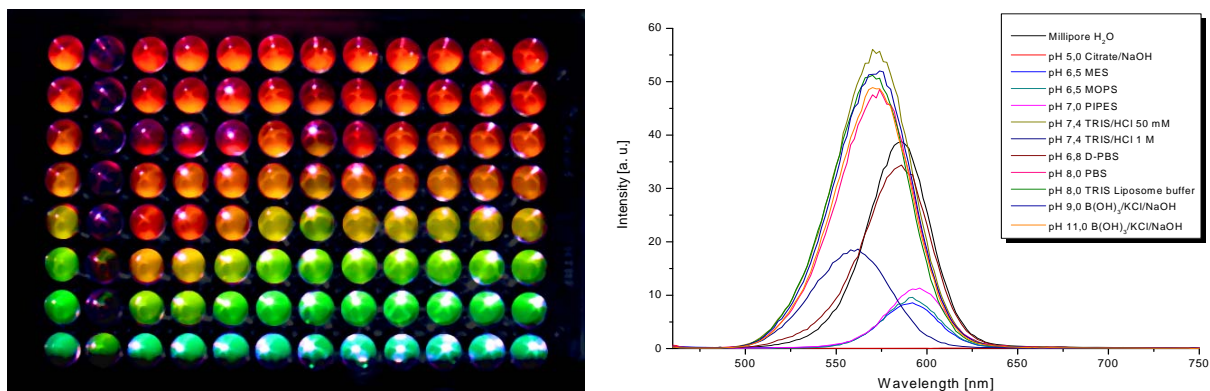


kinetics observed. Further investigations will also focus on measuring the change in absorption and light scattering as well as the interaction of thiol-capped particles with proteins, regarding the desired application in protein labelling.

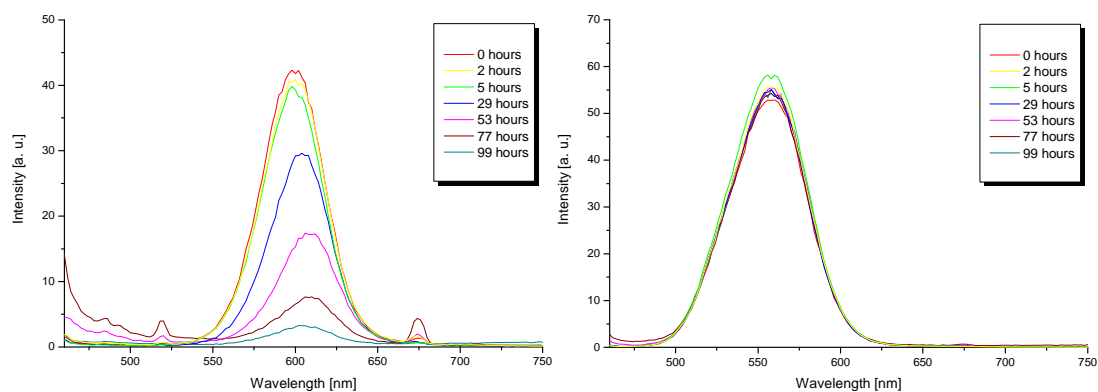
By using only three values,  $\partial I/\partial t$ ,  $D_k$ , and  $\Delta\lambda$ , a large number of dependant variables are reduced to a few parameters which may then be used to quantify the stability of a particular particle/buffer combination. The buffer concentration is not a variable that requires a large range, since biological application calls for specific, physiological concentrations.

### **Acknowledgement**

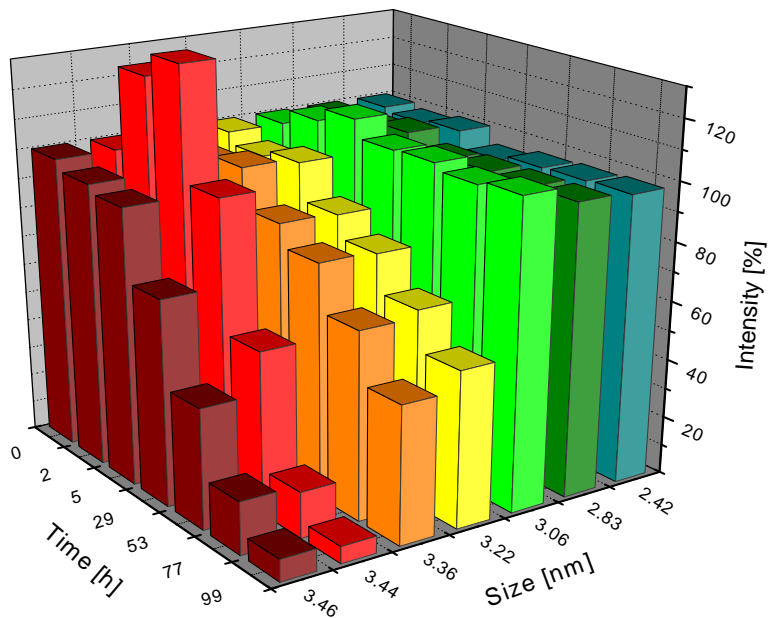
The authors are grateful to Dirk Dorfs, Nadja Bigall and Dr. Stephen Hickey for fruitful discussions and acknowledge financial support by the DIP D-3.1 “Functional Nanoparticle Architectures”.



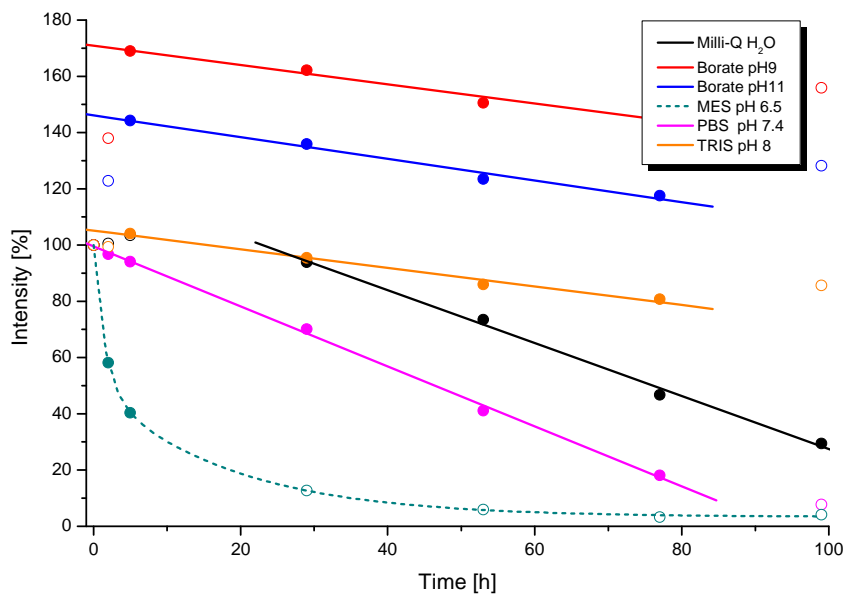
**Figure 1:** (a) True colour photograph of an  $8 \times 12$  wellplate with TGA-capped CdTe-QDs under a UV lamp after one day of incubation. The particle size decreases from top to bottom and lies between 3.46 and 2.42 nm. The buffers used are from left to right: Milli-Q  $H_2O$ , Citrate/NaOH pH 5.0, MES, MOPS, PIPES, TRIS/HCl 500 mM, TRIS/HCl 1 M, PBS pH 6.8, PBS pH 8.0, TRIS pH 8.0,  $B(OH)_3/KCl/NaOH$  pH 9.0,  $B(OH)_3/KCl/NaOH$  pH 11.0. (b) Fluorescence spectra of fraction TGA 5 (3.22 nm) after 20 hours in the named buffers.



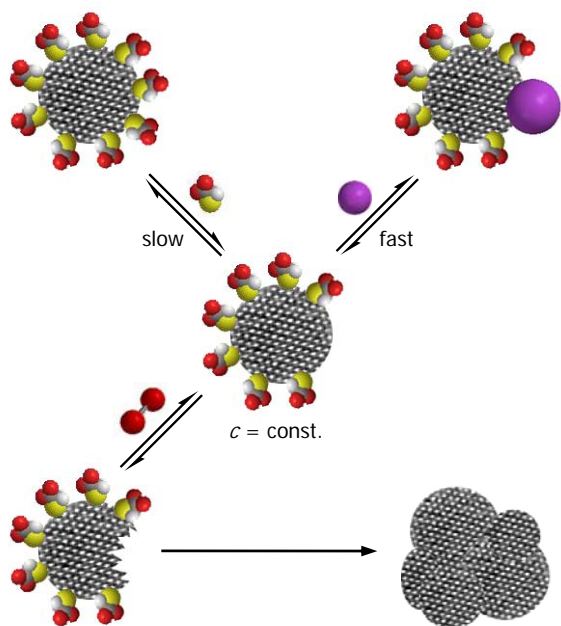
**Figure 2:** Fractions TGA 1 (a) and TGA 6 (b) in PBS (pH 7.4), observed over a time span of one week.



**Figure 3:** Relative intensity of all TGA-capped fractions in PBS (pH 7.4) with respect to time. The intensity at  $t = 0$  h was set to 100 %.



**Figure 4:** The temporal decrease in intensity for fraction TGA 1. Zero-order kinetics is recognized in many cases.



**Figure 5:** The proposed mechanism for a zero-order reaction is based on a constant, low number of free binding sites on the surface of the particles.

Name	Size [nm]	Color (PL UV)	$V_{3\text{mL}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	OD [a.u.]	$V_{100\mu\text{L}}$ [ $\mu\text{L}$ ]
TGA 1	3.46	red	20	0.05	2.4
TGA 2	3.44	red	20	0.16	0.75
TGA 3	3.40	red	20	0.12	0.99
TGA 4	3.36	orange	20	0.08	1.5
TGA 5	3.22	yellow	30	0.05	3.6
TGA 6	3.06	green	40	0.03	8.0
TGA 7	2.83	green	50	0.02	15

<b>TGA 8</b>	<b>2.42</b>	<b>light blue</b>	<b>60</b>	<b>0.01</b>	<b>36</b>
<b>MPA A</b>	<b>~ 3.6</b>	<b>red</b>	<b>90</b>	<b>0.09</b>	<b>6.14</b>
<b>MPA B</b>	<b>~ 3.6</b>	<b>red</b>	<b>30</b>	<b>0.10</b>	<b>1.82</b>
<b>MPA C</b>	<b>~ 3.6</b>	<b>red</b>	<b>100</b>	<b>0.03</b>	<b>21.43</b>
<b>MPA D</b>	<b>~ 3.6</b>	<b>red</b>	<b>60</b>	<b>0.05</b>	<b>7.35</b>
<b>MPA E</b>	<b>~ 3.6</b>	<b>red</b>	<b>120</b>	<b>0.05</b>	<b>14.4</b>
<b>MPA F</b>	<b>3.57</b>	<b>red</b>	<b>200</b>	<b>0.04</b>	<b>30.8</b>
<b>MPA G</b>	<b>3.53</b>	<b>red</b>	<b>200</b>	<b>0.05</b>	<b>25.0</b>

Table. 1: Size and OD of the particles used for the test. Due to the large full width half maximum of the first absorption maximum the size of the MPA-capped QDs could only be approximately determined.

Buffer	pH Value	Slope of Intensity <sup>a</sup> $\partial I/\partial t$ [%/h]	Critical Size <sup>b</sup> $D_k$ [nm]	Red Shift <sup>c</sup> $\Delta\lambda$ [nm]	Comment
Millipore Milli-Q H <sub>2</sub> O	7.0	- 0.94	2.42	- 2.1	
Citrate/NaOH	5.0	- <sup>e</sup>	-	- <sup>d</sup>	Destroyed all samples at once
B(OH) <sub>3</sub> /KCl/NaOH	9.0	- 0.39	3.44	- 2.1	
B(OH) <sub>3</sub> /KCl/NaOH	11.0	- 0.39	3.36	0.0	
MES	6.5	- <sup>e</sup>	< 2.42	19.9	No linear $\partial I/\partial t$
MOPS	6.5	- <sup>e</sup>	2.42	- <sup>d</sup>	Red shift about ~ 24 nm
PIPES	7.0	- <sup>e</sup>	< 2.42	- <sup>d</sup>	Red shift about ~ 24 nm
TRIS/HCl 500 mM	7.4	- 0.72	2.83	- <sup>d</sup>	
TRIS/HCl 1 M	7.4	- <sup>e</sup>	2.42	- <sup>d</sup>	Destroyed most of the samples

PBS	7.4	- 1.07	3.06	0.0	
PBS/glycine/saponin	7.4	- <sup>e</sup>	2.42	0.0	Saponin is an extract from the bark
2% BSA in PBS/gly/saponin	7.4	- <sup>e</sup>	< 2.42	- 4.0	of the South American soaptree
4 % PFA in PBS	7.4	- <sup>e</sup>	3.06	18.0	Low intensity, QDs > $D_k$ destroyed
MOWIOL	-	- <sup>e</sup>	-	22.0	non-aqueous medium
Medium	7.1	- <sup>e</sup>	< 2.42	32.9	complex mixture
Glycine in H <sub>2</sub> O	5.9	- 0.72	< 2.42	4.0	7.5 mg/mL Gly
TRIS	8.0	- 0.33	3.44	0.0	200 mM

<sup>a</sup> taken from fraction TGA 1. <sup>b</sup> for TGA-capped QDs. <sup>c</sup> for fraction TGA 6 after 2 hours of incubation. <sup>d</sup> no data. <sup>e</sup> decay not of pseudo-zero order kinetics.

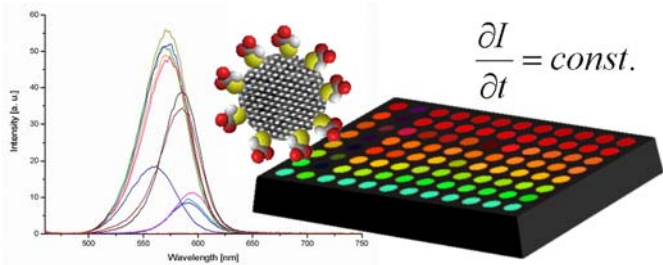
**Table 2:** Buffers employed in the studies.

## References

- (1) Eychmüller, A.: *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6514.
- (2) Gaponik, N.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Hoppe, K.; Shevchenko, E. V.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H.: *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 717.
- (3) Döllefeld, H.; Hoppe, K.; Kolny, J.; Schilling, K.; Weller, H.; Eychmüller, A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 4747.
- (4) Winter, J. O.; Liu, T. Y.; Korgel, B. A.; Schmidt, C. E.: *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1673.
- (5) Wang, S.; Mamedova, N.; Kotov, N. A.; Chen, W.; Studer, J.: *Nano Lett.* **2002**, *2*, 817.
- (6) Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Javier, A. M.; Gaub, H. E.; Stölzle, S.; Fertig, N.; Parak, W. J.: *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331.
- (7) Kirchner, C.; Javier, A.M.; Susha, A.S.; Rogach, A. L.; Kreft, O.; Sukhorukov, G. B.; Parak, W. J.: *Talanta* **2005**, *67*, 486.

- (8) Laatsch, A.: Diploma thesis, University of Hamburg **2002**.
- (9) Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X.: *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854.
- (10) a) Alivisatos, A. P.: *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 47, b) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S.: *Science* **2005**, *307*, 538.
- (11) Herron, N; Calabrese, J. C.; Farneth, W. E.; Wang, Y.: *Science* **1993**, *259*, 1426.
- (12) Vossmeier, T.; Reck, G.; Katsikas, L.; Haupt, E. T. K.; Schulz, B.; Weller, H.: *Science* **1995**, *267*, 1476.
- (13) Rockenberger, J.; Tröger, L.; Rogach, A. L.; Tischer, M.; Grundmann, M.; Eychmüller, A.; Weller, H.: *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 7807.
- (14) Kasuya, A.; Sivamohan, R.; Barnakov, Y. A.; Dmitruk, I. M.; Nirasawa, T.; Romanyuk, V. R.; Kumar, Mamykin, S. V.; Tohji, K.: *Nature Materials* **2004**, *3*, 99.
- (15) Aldana, J.; Wang, Y. A.; Peng, X.: *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8844.
- (16) Gao, M.; Kirstein, S.; Möhwald, H.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H.: *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8360.
- (17) Zhang, H.; Zhou, Z.; Yang, B.; Gao, M.: *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8.
- (18) Spanhel, L.; Haase, M.; Weller, H.; Henglein, A.: *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5649.

ToC Graphic:





# Size and Surface Effects on the MRI Relaxivity of Manganese Ferrite Nanoparticle Contrast Agents

*Ulrich I. Tromsdorf<sup>†\*</sup>, Nadja C. Bigall<sup>†\*</sup>, Michael G. Kaul<sup>§</sup>, Oliver T. Bruns<sup>†</sup>, Marija S. Nikolic<sup>†</sup>, Birgit Mollwitz<sup>‡</sup>, Ralph A. Sperling<sup>††</sup>, Rudolph Reimer<sup>#</sup>, Heinz Hohenberg<sup>#</sup>, Wolfgang J. Parak<sup>††</sup>, Stephan Förster<sup>†</sup>, Ulrike Beisiegel<sup>†</sup>, Gerhard Adam<sup>§</sup> and Horst Weller<sup>†\*\*</sup>*

<sup>†</sup> Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

<sup>§</sup> Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>‡</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II: Molecular Cell Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>††</sup> Ludwig-Maximilians-University, Center of NanoScience, Amalienstraße 54, 80799 Munich, Germany

<sup>#</sup> Department of Electron Microscopy and Micro Technology, Heinrich-Pette Institute, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany

\* These authors contributed equally to this work

\*\* Corresponding author: E-Mail: [weller@chemie.uni-hamburg.de](mailto:weller@chemie.uni-hamburg.de)

**RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)**

## Abstract

Superparamagnetic  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocrystals of different sizes were synthesized in high-boiling ether solvent and transferred into water using three different approaches. First, we applied a ligand exchange in order to form a water soluble polymer shell. Second, the particles were embedded into an amphiphilic polymer shell. Third, the nanoparticles were embedded into large micelles formed by lipids. Although all approaches lead to effective negative contrast enhancement we observed significant differences concerning the magnitude of this effect. The transverse relaxivity, in particular  $r_2^*$ , is greatly higher for the micellar system compared to the polymer coated particles using same sized nanoparticles. We also observed an increase in transverse relaxivities with increasing particle size for the polymer coated nanocrystals. The results are qualitatively compared with theoretical models describing the dependence of relaxivity on the size of magnetic spheres.

**KEYWORDS** Manganese Ferrite nanocrystals, phase transfer, MRI contrast agent

Magnetic nanoparticles became more and more important for applications in biotechnology and biomedicine<sup>1</sup> as well as technical ones like magnetic data storage<sup>2</sup> over the past few years. Examples are magnetothermal therapy<sup>3,4</sup> or *in vivo* imaging<sup>5-7</sup>. Here we present the synthesis and potential use of superparamagnetic manganese ferrite nanocrystals ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging (MRI)<sup>8</sup>. Whereas enormous progress has been achieved in the technological development of MRI including sophisticated pulse sequences for image generation, the development of chemical contrast agents still has a great potential for improvement. In particular,  $T_2$ -contrast agents under clinical use consist of very polydisperse and aggregated iron oxide nanoparticles. Recent investigations impressively show that the contrast enhancement of nanoparticles is strongly determined by their size, surface properties and the degree of aggregation<sup>9,10,11</sup>. The aim of this work is to clearly distinguish between these effects by using monodisperse samples of 3-18 nm  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  particles and to subject

these samples to various methods of surface functionalisation and compartmentalisation in lipid micelles. We will also distinguish between the impact of these effects in the various pulse sequence modes for the detection of both the transverse relaxation ( $T_2$ -process) and the effective transverse relaxation ( $T_2^*$ -process).

The MRI signal that is detected after the excitation of magnetic moments by a radio frequency (rf) pulse is determined by the examined object and the imaging sequence. The imaging sequence is weighting the impact of the net magnetisation of hydrogen atoms and the relaxation mechanisms. The first mechanism describes the relaxation to the equilibrium occupancy of  $\alpha$  and  $\beta$  spins and is referred to as longitudinal or spin-lattice relaxation. This process is characterised by the time constant  $T_1$ . The second mechanism characterises the dephasing of coherent spins which are generated during the rf-pulse and is referred to as transverse or spin-spin relaxation with the time constant  $T_2$ . Furthermore, the effective transverse relaxation time  $T_2^*$  describes the relaxation increase due to additional inhomogeneities in the magnetic field. These inhomogeneities can be caused by the non perfect homogeneous magnetic field itself or by susceptibility effects implied by tissue interfaces with different magnetisation or by para- and ferromagnetic materials. Therefore,  $T_2^*$  can be significantly smaller than  $T_2$ . Whereas the  $T_1$  relaxation leads to an increase in signal intensity and thus causing positive contrast, the  $T_2$  and  $T_2^*$  processes result in signal loss and negative contrast with conventional imaging techniques. Since superparamagnetic nanoparticles greatly shorten  $T_2$  and  $T_2^*$  due to their large magnetic moment they commonly act as negative contrast agents. This effect is quantified in the concentration independent transverse relaxivities  $r_2$  and  $r_2^*$ , that is the ability of the contrast agent to shorten  $T_2$  and  $T_2^*$ , respectively, per millimolar concentration of paramagnetic ions.  $MnFe_2O_4$  nanoparticles have recently been demonstrated to act as powerful negative contrast agents<sup>11</sup> and were even stronger than magnetite.

In order to synthesise the nanoparticles we used the high temperature organometallic synthesis reported by Kang et al. which yields highly crystalline and monodisperse nanocrystals with no tendency to agglomerate.<sup>12a</sup> This method is based on thermal decomposition of  $Fe(CO)_5$  and  $Mn_2(CO)_{10}$  resulting

in the formation of FeMn alloy nanoparticles followed by oxidation with trimethylamine-N-oxide. The synthesis yielded nearly monodisperse nanoparticles (less than 10 % standard deviation), which were characterised by transmission electron microscopy (TEM) (fig. 1) and X-ray diffraction (XRD) (Supporting Information Figure S1). EDX measurements indicated that the ratio of iron and manganese was almost 2:1. By varying the ratio of initial precursor to oleic acid, particles between 3 and 18 nm could be synthesized. Moreover, we used a hot injection method based on a modification of ref. 12b. The high temperature reaction of iron(III)acetylacetonate and manganese(II)acetylacetonate with 1,2-hexadecanediol in the presence of oleic acid and oleyl amine yielded polydisperse samples which could be easily separated into size fractions of 4.5, 6 and 7.5 nm (standard deviation approximately 10 %), respectively (fig. 1). Moreover, the ratio of manganese to iron decreased from 0.32 for the 4.5 nm particles to 0.12 for 7.5 nm particles.

Due to the synthesis conditions the particles are hydrophobic and, thus, not soluble in aqueous media. In order to transfer the nanoparticles into water we used different approaches. In the first one we applied a ligand exchange of oleic acid against a water soluble copolymer obtained by coupling poly(ethylene glycol) to a small branched poly(ethylene imine), PEG-PEI, which has already been employed for CdSe/CdS nanocrystals<sup>13</sup> and will be referred to as “exchange” here. This copolymer ligand consists of a branched PEI moiety with a molecular weight of 400 g/mol and two PEG chains attached to it with molecular weight of 5000 g/mol. We used three different sizes (3, 9 and 18 nm) of nanoparticles in order to investigate size dependent effects on contrast enhancement. In another approach the above mentioned hydrophobic manganese doped iron oxide nanoparticles were encapsulated within an amphiphilic polymer shell according to Pellegrino et al.<sup>14</sup>, which consists of poly(maleic anhydride-alt-1-tetradecene) and is crosslinked by bis(6-aminoethyl)amine. For simplification we will call it “encapsulation”. Finally we employed an embedding of the nanoparticles into lipid micelles without a ligand exchange. Several block copolymer micelles loaded with iron oxide nanoparticles have recently been demonstrated to act as excellent negative contrast enhancers<sup>6,15</sup>. The different processes are pictured in scheme 1.

The PEG-PEI block copolymer employed for the ligand exchange possesses multiple amino groups which can bind to the particle surface. In order to compare the results of ligand exchange to the other approaches it is essential to know whether the particles are individually dispersed or whether they tend to aggregate. Therefore, we performed dynamic light scattering experiments the results of which are depicted in fig. 2.

First, it can be noticed from fig. 2a that the hydrodynamic diameter increases after ligand exchange from 15 nm to 30 nm and 40 nm in water and chloroform, respectively, due to the larger polymer shell. It is further observable that the size distribution of nanoparticles which are covered with PEG-PEI copolymer is not significantly broadened after ligand exchange indicating that the particles do not tend to form larger agglomerates, but exist as individually dispersed particles with a narrow size distribution in both water and chloroform. In addition, fig. 2b shows that the difference in hydrodynamic diameter between nanoparticles with core size of 9 and 18 nm is about 10 nm, demonstrating approximately the same thickness of the polymer shell for particles with different core sizes. Individually dispersed particles were also present after encapsulating the hydrophobic particles in an amphiphilic copolymer shell. This was confirmed by gel electrophoresis and size exclusion chromatography. A TEM image of the as prepared nanoparticles is shown in fig. 3a. It is observable that the particles are still well separated after the phase transfer.

The third approach of embedding the particles into lipid micelles differs substantially from the other processes, since the particles are concentrated to the small volume in the micellar core. TEM images (fig. 3b) demonstrated the nanoparticles to be randomly distributed inside the micelles. Dynamic light scattering measurements indicated that the micelles are about 250 nm in diameter with a broad size distribution.

In order to check whether the different postpreparative treatments have a significant influence on the magnetisation behaviour of the nanocrystals we measured the magnetic mass susceptibility of 9 nm  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  particles before and after ligand exchange as well as after embedding them into lipid micelles. We found values of  $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg Fe}$  for both as prepared and after ligand exchange and  $1.0 \cdot 10^{-4}$  for the

micelle sample, respectively. The deviation is rather small and probably within the experimental error of the magnetic measurements and iron analytics.

MRI measurements were carried out on a clinical 3 Tesla magnetic resonance scanner at room temperature, using three different sizes of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles (3, 9 and 18 nm) with a shell of PEO-PEI copolymer. Furthermore, MRI measurements were accomplished on the 4.5, 6.0 and 7.5 nm manganese doped iron oxide particles which were transferred into water using Pellegrino's approach, thus forming a comparable system, as the particles are individually dispersed in both cases. In contrast, several sizes of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  and manganese doped iron oxide nanoparticles were embedded into lipid micelles. As a reference we measured Resovist® (Schering), a commercially used contrast agent, consisting of iron oxide. For further discussion we will focus on transverse relaxation process. For a  $T_2^*$  map, reconstructed from  $T_2^*$ -weighted data from a multi-echo gradient echo sequence showing a concentration series of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles beside a concentration series of Resovist® see Supporting Information Figure S2.

From the experimental values  $r_2$  and  $r_2^*$  were determined as exemplary shown in fig. 4a. Here the reciprocal relaxation times  $1/T_2^* = R_2^*$  defined as the relaxation rates are plotted versus the concentration of paramagnetic ions. The slopes of these curves yield the concentration independent relaxivities,  $r_2$  and  $r_2^*$ , respectively which will be used in the further discussion. These values are plotted in fig. 4b as a function of particle size. All results are also summarised in Table S1 (Supporting Information).

First it can be noticed from fig. 4b, that in the case of polymer coated samples, the transverse relaxivities ( $r_2$  and  $r_2^*$ ) increase with increasing particle size for the polymer exchanged and encapsulated particle systems. Fig. 4a demonstrates this fact, as the slope of the straight line is higher for larger particles. Furthermore, we observed only small differences between  $r_2$  and  $r_2^*$ . In the case of encapsulated particles one has to take into account that the ratio of iron and manganese increased with increasing particle size for the manganese doped iron oxides. An effect of changing composition is thus superimposing the size dependence for these particles.

On the other hand  $r_2$  and  $r_2^*$  of the particle loaded micelles were higher than those of the corresponding polymer coated samples. We also observed significant differences between  $r_2$  and  $r_2^*$  up to one order of magnitude (fig. 4b). The strong decrease in  $r_2^*$  with increasing particle size is in contrast to the expected behaviour. A possible explanation could involve different degrees of particle loading within the micelles. In a control experiment we investigated different loadings with pure  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  of 6 nm size in order to eliminate size and composition effects. As can be seen from fig. 4c  $r_2$  and  $r_2^*$  differ significantly if the loading ratio is changed from 0.025 to 0.05 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  per 1 mg lipid. Thus, the very high  $r_2^*$  relaxivities for the micelles are probably due to the relatively high particle density within the micelles, which may cause an increased interparticle interaction inside the hydrophobic cores. Such strong particle interactions might be induced by the static magnetic field of the tomograph. Indeed we found that even small permanent magnets induce an aggregation of particles in solution. Thus, compartmentalisation of nanoparticles in the lipid core of the micelles strongly favours a spacially confined aggregation and thereby produces strong field gradients in the environment.

For the contrast enhancement of magnetic spheres different regimes are predicted<sup>16,17</sup>. The first one, which is called “Motional Averaging Regime” (MAR) or “Motional Narrowing Regime” describes the transverse relaxation for relatively small particles, which are homogeneously dispersed in solution. This theory implies, that water diffusion between particles occurs on a much faster time scale than the resonance frequency shift and predicts identical values for  $R_2$  and  $R_2^*$ . In this regime the transverse relaxivity increases with increasing particle size. For larger particles this theory breaks down. In this case the relaxation rates are given by the “Static Dephasing Regime” (SDR) theory. The SDR, first introduced by Yablonskiy and Haacke<sup>18</sup>, implies that a large magnetic perturber produces strong dipolar fields in its surrounding the result of which is the fact, that, in contrast to the MAR, diffusion has a minimal influence on Nuclear Magnetic Resonance signal decay. The SDR places an absolute limit in the transverse relaxation rate: Increasing the perturber size will not result in higher relaxation rates. Thus, a plateau is reached. However,  $R_2$  is always lower than  $R_2^*$ , reflecting the fact, that the use of refocusing pulses in spin echo sequences leads to a decrease in signal decay (“Echo-Limiting”),

particularly for large magnetic spheres and short echo times. Recently, these regimes have been experimentally demonstrated to exist for an induced clustering process in solution<sup>19</sup> as well as for cells loaded with iron oxides<sup>20</sup>.

The transverse relaxivity for the polymer coated particles increases with increasing size, thus showing typical behaviour of particles in the MAR.  $r_2$  and  $r_2^*$  should be equal, a condition, which is basically fulfilled, since the phase loss is mainly caused by diffusion effects in this regime and is thus irreversible with respect to a refocusing pulse. Similar results were obtained for the encapsulated manganese doped iron oxide nanoparticles. On the other hand the transverse relaxivities of the micelles are likely to be describable by the “Echo-Limiting” due to the big differences between  $r_2$  and  $r_2^*$ . Thus, the ceiling for  $r_2^*$  given by the SDR should be achieved for the considered systems. For micelles loaded with a higher amount of magnetic nanoparticles larger  $r_2^*$  values are observed. This effect is also predicted by SDR theory as the value of  $R_2^*$  is proportional to the magnetisation of the sphere, i.e.  $R_2^*$  increases with increasing local magnetic dose (LMD)<sup>18</sup> and thus by particle aggregation. In addition,  $r_2^*$  is remarkably high, indicating that these micelles could act as powerful negative contrast agents. In this size range refocusing pulses could be effective, and, as a result  $r_2$  is significantly lower than  $r_2^*$ . On the other hand, for a further increase in size of the superparamagnetic core of polymer coated particles, the increase in  $r_2$  and  $r_2^*$  should be violated at some point due to the decreasing influence of diffusion and thus reaching the SDR condition. Furthermore, the dephasing proton spins of the lipid molecules contribute also to the signal reduction due to the high viscosity of these molecules. This effect has been demonstrated in an experiment where the iron oxide nanoparticles were dispersed in pure olive oil. Large relaxivities were observed in this case. Therefore the SDR condition is expected to be reached at even smaller perturber sizes within the micelles due to the lower diffusion velocities. Future work will deal with a comprehensive investigation of these effects.

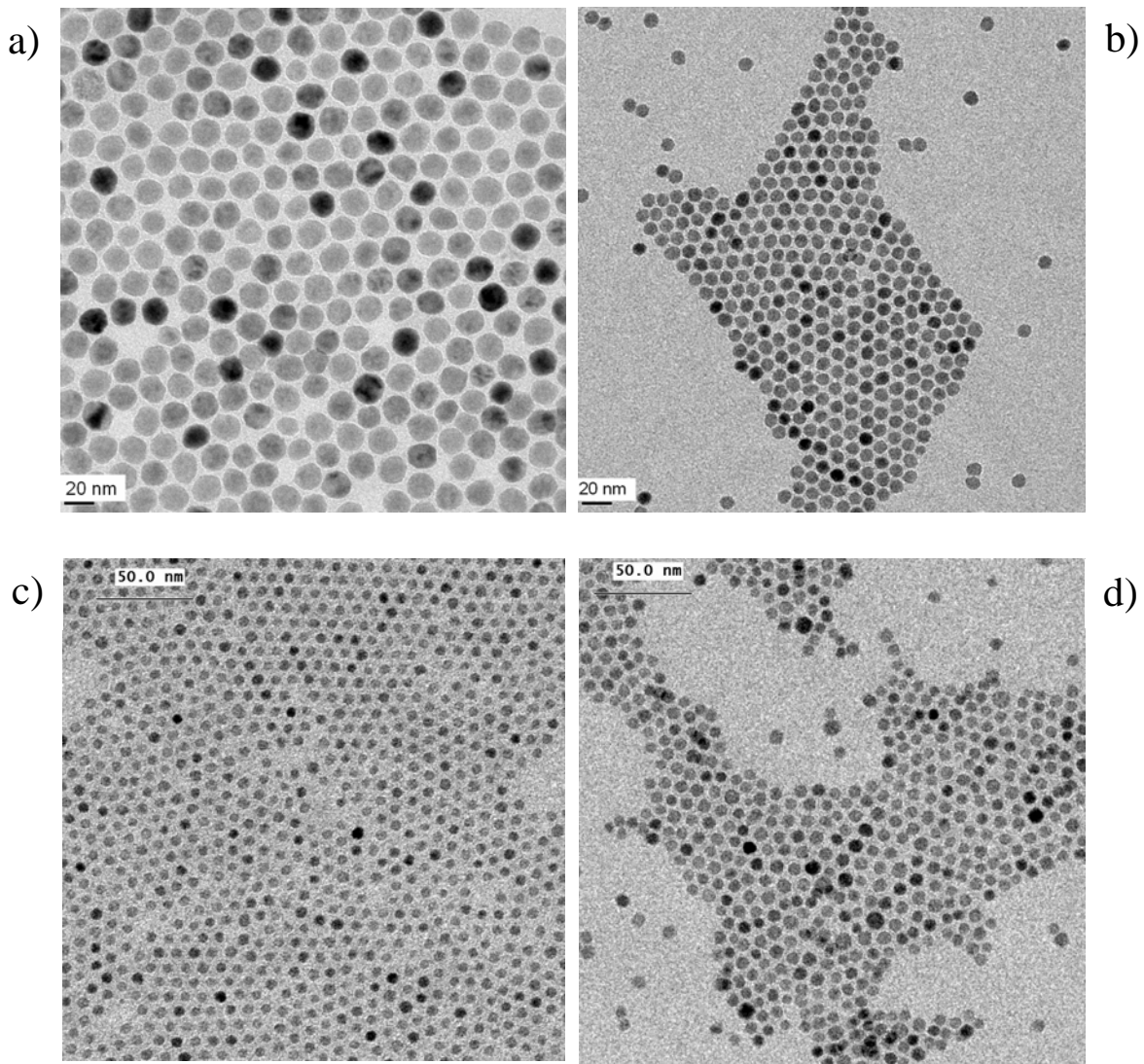
In conclusion, we comparatively investigated the capability of highly crystalline and monodisperse  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles to enhance negative contrast in MRI with respect to appropriate matrices. For these purposes we applied a ligand exchange with poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ethylene imine)



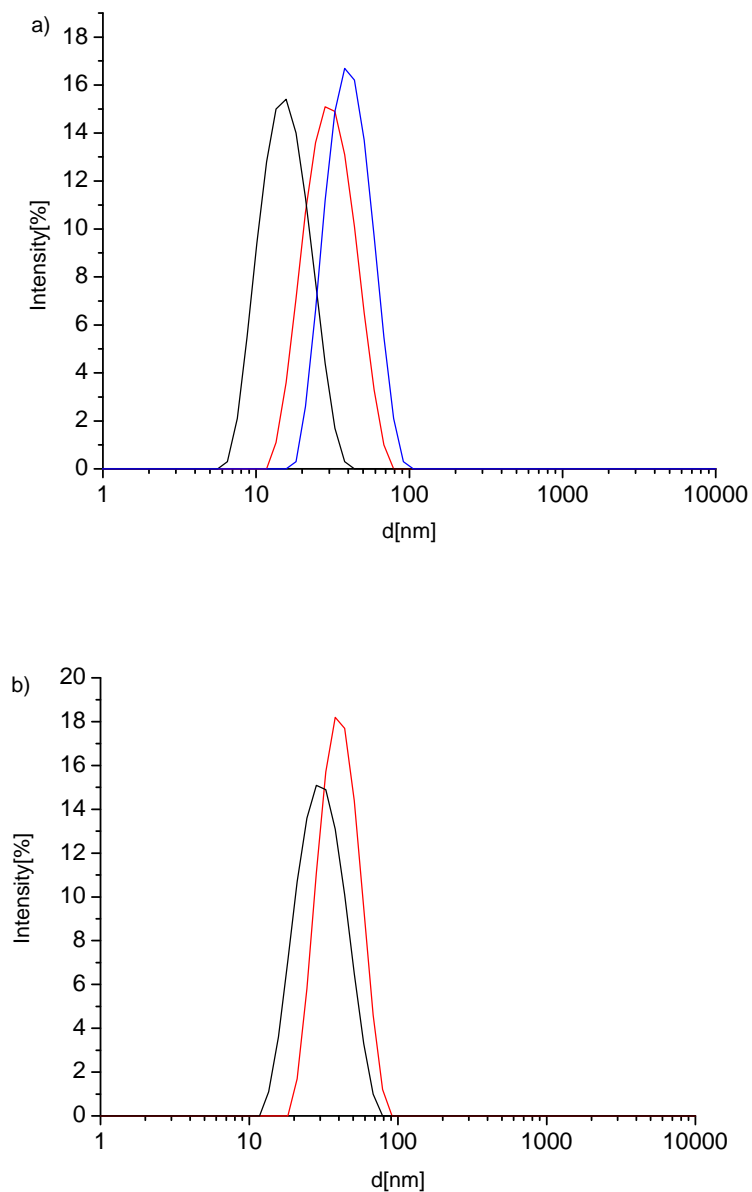
copolymer, a coating of hydrophobic nanoparticles with amphiphilic polymer as well as an embedding of nanoparticles into large lipid micelles. We found that individually, homogeneously dispersed nanoparticles satisfy MAR theory, since transverse relaxivities,  $r_2$  and  $r_2^*$ , increase with increasing core size. On the other hand, if these particles are embedded into lipid micelles, they greatly enhance contrast in  $T_2^*$  weighted images which is in agreement with the Static Dephasing Regime theory. Reasonable explanations for this behaviour are the controlled particle aggregation as well as a very low influence of diffusion effects of lipid molecules inside the micelles and water molecules in their surrounding. Further investigations in terms of bioapplicability are currently underway.

**ACKNOWLEDGMENT** We thank The Free and Hanseatic City of Hamburg for funding the Molecular Imaging North (MOIN) project. The authors furthermore thank Rosemarie Kongi, Barbara Holstermann and Sylvia Bartholdi-Nawrath for excellent technical assistance. Oliver Bruns is supported by a fellowship from the Studienstiftung des Deutschen Volkes.

**SUPPORTING INFORMATION PARAGRAPH** Detailed experimental procedures and additional data on magnetic and structural characterisation

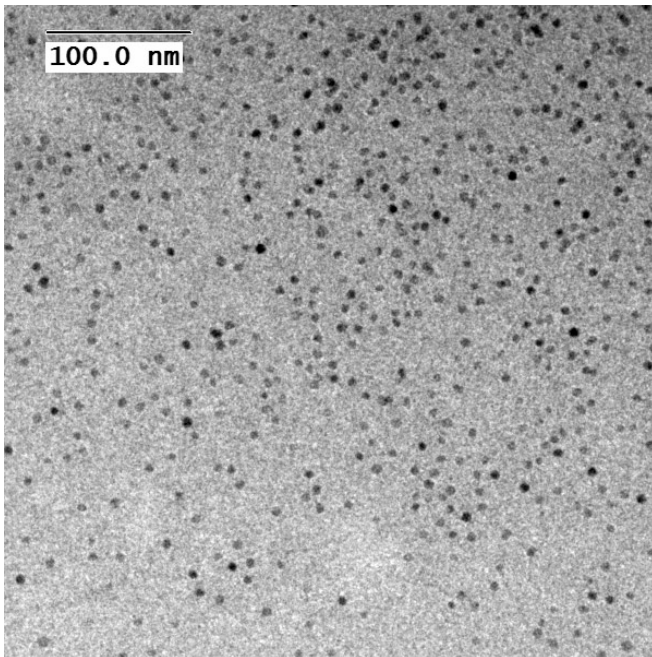


**Figure 1.** TEM image of 18 nm (a) and 9 nm (b) monodisperse samples (less than 10 % standard deviation) of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocrystals as well as fractions of 6 nm (c) and 7.5 nm (d) manganese doped iron oxide nanoparticles (standard deviation about 10 %)

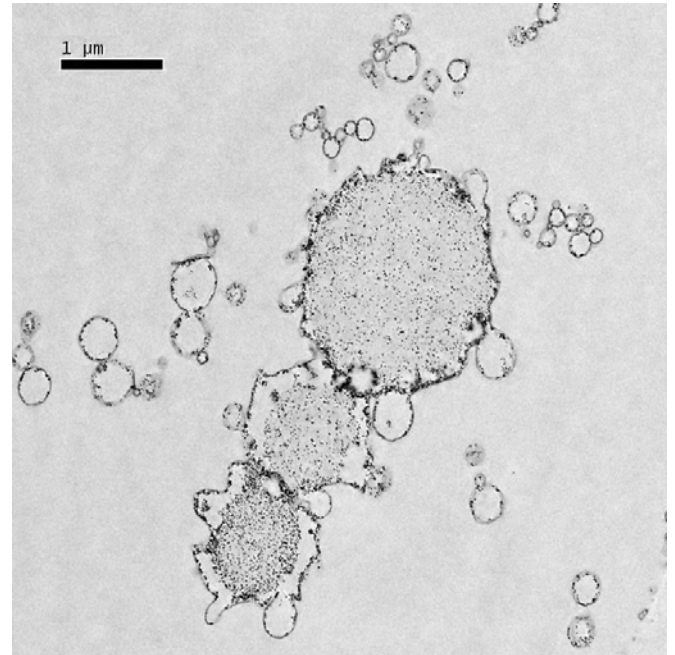


**Figure 2.** a) Hydrodynamic diameter of the 9 nm nanoparticles (core size) before (black curve) ligand exchange in chloroform and after ligand exchange with PEO-PEI copolymer in water (red curve) and chloroform (blue curve) b) Hydrodynamic diameter of PEO-PEI coated particles with 9 nm (black curve) and 18 nm (red curve) core size in water

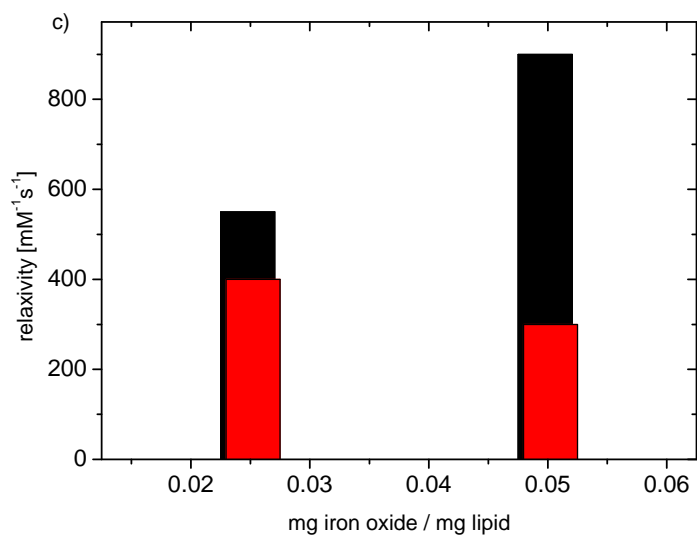
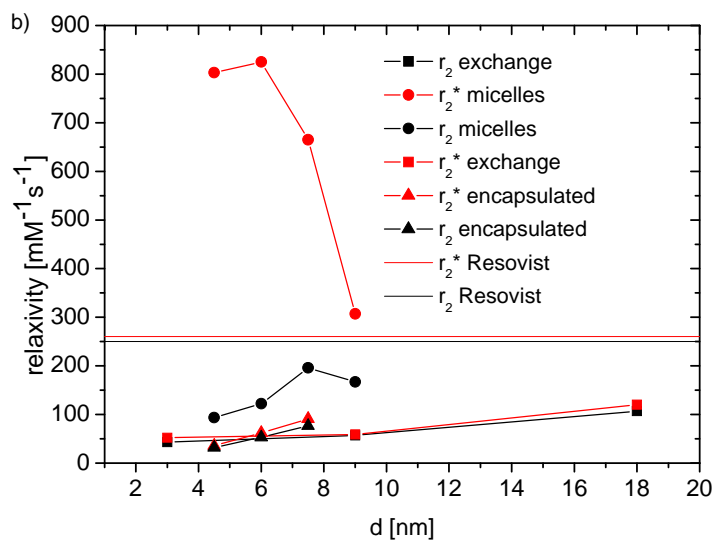
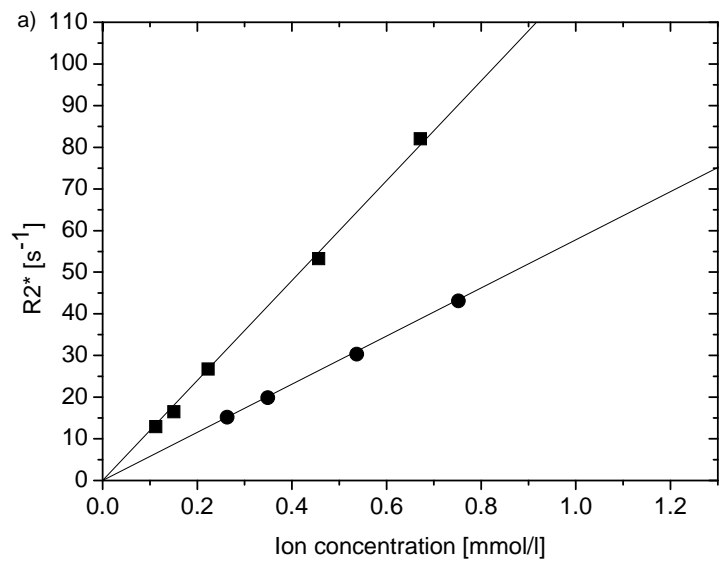
a)



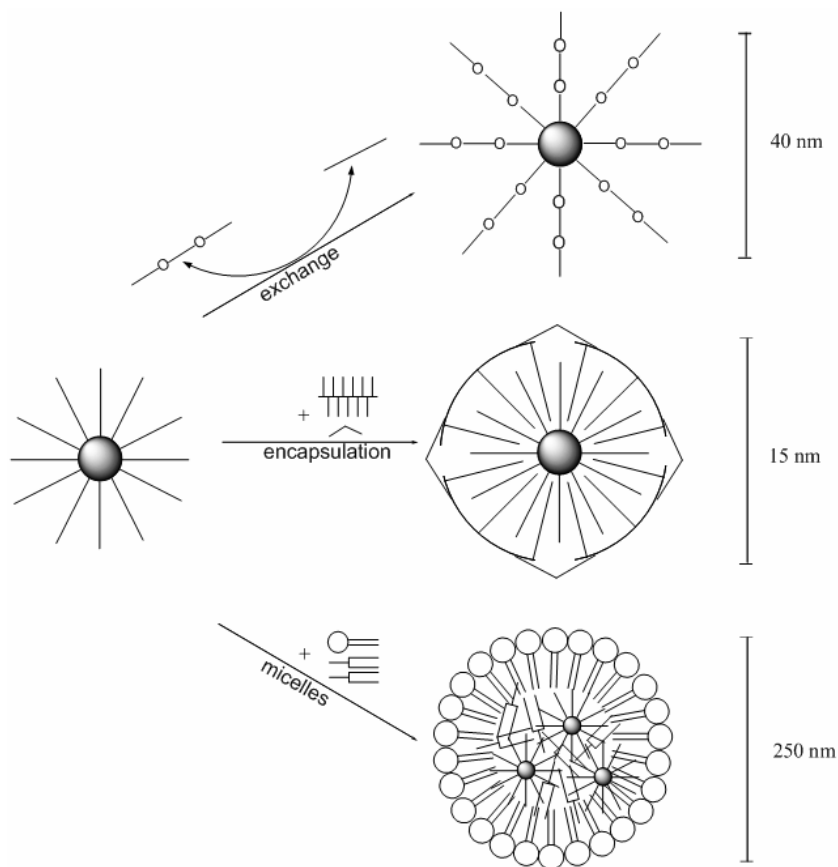
b)



**Figure 3.** TEM images of manganese doped iron oxide nanoparticles coated with amphiphilic polymer shell confirming that particles are still well separated after phase transfer (a) and lipid micelles loaded with nanoparticles showing a random distribution within lipid phase and that the particles do not agglomerate within the micelles (b)



**Figure 4.** Relaxation rates  $R_2^*$  for 9 (circles) and 18 nm (squares)  $MnFe_2O_4$  nanocrystals with respect to a concentration series (a).  $r_2$  (red spots) and  $r_2^*$  (black spots) for PEO-PEI coated particles (squares), encapsulated particles (triangles) and nanoparticle loaded micelles (circles) (b). Whereas  $r_2$  and  $r_2^*$  are almost equal in case of homogeneously dispersed particles,  $r_2^*$  is greatly higher than  $r_2$  for the micelles.  $r_2$  (red bar) and  $r_2^*$  (black bar) for micelles loaded with different amounts of iron oxide nanoparticles (6 nm) indicating that  $r_2^*$  increases with increasing loading whereas  $r_2$  slightly decreases (c)



**Scheme 1.** Schematic illustration of the phase transfer approaches: Ligand exchange of oleic acid against water soluble polymer (above), coating of individual nanoparticles with amphiphilic polymer and embedding into lipid micelles (below).

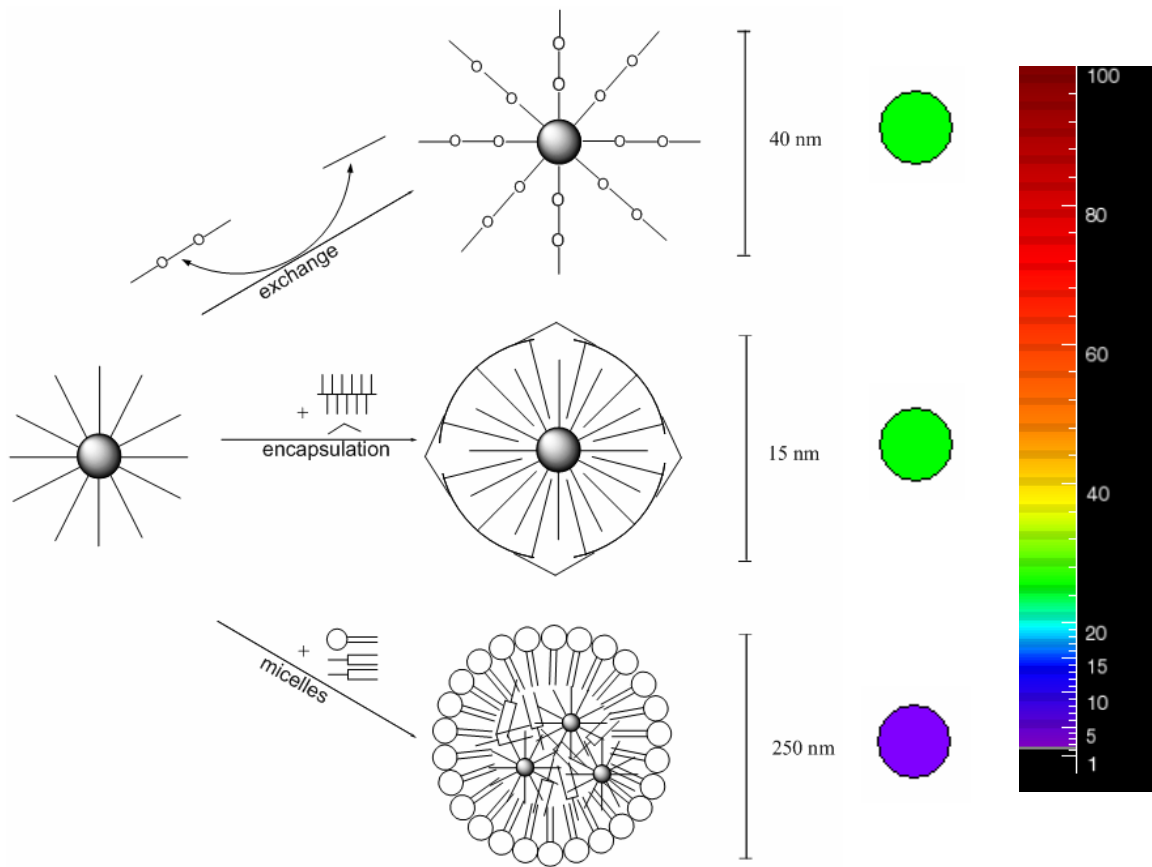
## References

- 1 Bomati-Miguel, O.; Morales, M. P.; Tartaj, P.; Ruiz-Cabello, J.; Bonville, P.; Santos, M.; Zhao, X.; Veintemillas-Veredagner, S. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5695.
- 2 Huber, D. L. *Small* **2005**, *1*, 482-501.
- 3 Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Felix, R.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413-419.
- 4 Gonzales, M.; Krishnan, K. M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 265-270.
- 5 Jun, Y. W.; Huh, Y. M.; Choi, J.S.; Lee, J.H; Song, H. T.; Kim, S.; Yoon, S.; Kim, K. S.; Shin J. S.; Suh, J. S.; Cheon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5732-5733.
- 6 Nasongkla, N.; Bey, E.; Ren, J.; Ai, H.; Khemtong, C.; Guthi, J. S.; Chin, S.-F.; Sherry, A. D.; Boothman, D. A.; Gao, J. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2427-2430.
- 7 Huh, Y.-M.; Jun, Y.-W.; Song, H.-T.; Kim, S.; Choi, J.-S.; Lee, J.-H.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; Cheon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12387.
- 8 Taupitz, M.; Schmitz, S.; Hamm, B. *Rofo* **2003**, *175*, 752.
- 9 Perez, J. M.; Josephson, L.; O’Loughlin, T.; Högemann, D.; Weissleder, R. *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 816-820.
- 10 Berret, J. F.; Schonbeck, N.; Gazeau, F.; El Kharrat, D.; Sandre, O.; Vacher, A.; Airiau, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1755.
- 11 Lee, J.-H.; Huh, Y.-M.; Jun, Y.-w.; Seo, J.-w.; Jang, J.-t.; Song, H.-T.; Kim, S.; Cho, E.-J.; Yoon, H.-G.; Suh, J.-S.; Cheon, J. *Nature Med.* **2007**, *13*, 95-99.
- 12a Kang, E.; Park, J.; Hwang, Y.; Kang, M.; Park, J.; Hyeon, T. *J. Phys. Chem. B.* **2004**, *108*, 13932-13935.



- 12b Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279.
- 13 Nikolic, M. S.; Krack, M.; Aleksandrovic, V.; Kornowski, A.; Förster, S.; Weller, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6577-6580.
- 14 Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703-707.
- 15 Ai, H.; Flask, C.; Weinberg, B.; Xintao, S.; Pagel, M. D.; Farrell, D.; Duerk, J.; Gao, J. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1949-1952.
- 16 Gillis, P.; Moiny, F.; Brooks, R. A. *Magn. Reson. Med.* **2002**, *47*, 257-263.
- 17 Brooks, R. A.; Moiny, F.; Gillis, P.; *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 1014-1020.
- 18 Yablonskiy, D. A.; Haacke, E. M. *Magn. Reson. Med.* **1994**, *32*, 749-763.
- 19 Roch, A.; Gossuin, Y.; Muller, R. N.; Gillis, P. *J. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 532.
- 20 Bowen, C. V.; Zhang, X.; Saab, G.; Gareau, P. J.; Rutt, B. K. *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 52-61.

Image for the table of contents:



## Supporting Information

### Size and Surface Effects on the MRI Relaxivity of Manganese Ferrite Nanoparticle Contrast Agents

*Ulrich I. Tromsdorf, Nadja C. Bigall, Michael G. Kaul, Oliver T. Bruns, Marija S. Nikolic, Birgit Mollwitz, Ralph A. Sperling, Rudolph Reimer, Heinz Hohenberg, Wolfgang J. Parak, Stephan Förster, Ulrike Beisiegel, Gerhard Adam and Horst Weller*

#### **A. General**

Absolute ethanol, methanol, chloroform, hexane were used as received from Merck. Dimanganese decacarbonyl (Merck, 99 %), oleic acid (Aldrich, 99+ %), 1,2-hexadecanediol (Aldrich, 90 %), benzyl ether (Aldrich, 99 %), iron(III)acetylacetonate (Strem, 99 %), manganese(II)acetylacetonate (Aldrich, 99 %), oleyl amine (Fluka, >70 %) octyl ether (Fluka, >97 %), iron pentacarbonyl (Fluka, >97 %), trimethylamine-N-oxide (Aldrich, 98 %) were also used as received.

Nanoparticle characterisation: Dynamic light scattering was carried out using a Malvern Zeta Sizer Nano-ZS. Transmission electron microscopy (TEM) images and energy dispersive X-ray (EDX) data were obtained using a Philips CM-300 microscope (300 kV). X-ray diffraction was measured on a Philips X'Pert under Cu K $\alpha$  radiation.

For electron microscopic analysis of the micelles, samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature, washed, and postfixed for 30 min with 1% OsO<sub>4</sub> in PBS. For ultrathin sectioning, the samples were gradually dehydrated with ethanol and embedded in ERL resin. Ultrathin sections were counterstained with 2% uranyl acetate and lead citrate. These electron micrographs were obtained with a Philips CM 120 transmission electron microscope at 60 kV.

Magnetic susceptibility measurements were done on a Johnson Matthey Chemicals magnetic susceptibility balance.

MRI measurements: All samples were measured at 3 T on a clinical MRI scanner (3T Intera, Philips Medical Systems) at room temperature in a water bath. The impact of  $T_2$  and  $T_2^*$  were measured with multiecho-sequences based on a spin-echo sequence and a gradient-echo sequence, respectively. Then the relaxation times  $T_2$  and  $T_2^*$  were numerically estimated by exponential fitting of the MRI data with experimental software and converted into their reciprocal, the relaxation rates  $R_2$  and  $R_2^*$ . The corresponding relaxivities  $r_2$  and  $r_2^*$  are the gradients of the relaxation rate to iron concentration curves and were determined by linear regression.

Determination of iron concentration: The concentration of iron was determined using a commercial graphite tube Atomic Absorption Spectrometer (Perkin-Elmer 4100) after digestion of the particles using a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide (5:1, v/v).

## **B. Synthesis**

B1. Synthesis of  $MnFe_2O_4$  nanoparticles: Following reported procedures by Kang et al.<sup>10</sup> to synthesize 9 nm particles we dissolved 0.9 mmol  $Mn_2(CO)_{10}$  and 2.3 mL oleic acid in 10 g of octyl ether. The mixture was slowly heated to 130 °C under vigorous stirring. 0.2 mL  $Fe(CO)_5$  were rapidly injected and the yellow mixture was heated to 300 °C for 1 h under intensive stirring. After cooling down to room temperature 0.34 g trimethylamine-*N*-oxide were added. The dark brown solution was heated to 140 °C under nitrogen for 1 h and then further heated to 300 °C for 1 h.

After cooling down to room temperature the sample was washed two times through addition of large excess of ethanol, centrifugation at 4500 rpm followed by redispersion in hexane. The as prepared dispersion was stable and could be stored for weeks at room temperature.

B2. Synthesis of manganese doped iron oxide nanoparticles: In a dry nitrogen atmosphere a solution of 5.16 g 1,2-hexadecanediol, 3.38 g oleic acid and 3.2 g oleylamine in 34 mL dibenzyl ether was degassed and heated to 200 °C under stirring. Subsequent a 80 °C solution of 338 mg  $Mn(\text{acetyl acetate})_2$  and 938 mg  $Fe(\text{acetyl acetate})_3$  in 6 mL dibenzyl ether (also heated under nitrogen) was injected. After 30 minutes heating at 200 °C the mixture was refluxed at approximately 295 °C (boiling point of dibenzyl ether) for another 30 minutes and then cooled to room temperature. Particles of different size (4.5 nm, 6 nm and 7.5 nm

diameter) were separated from the solvent by common size selective precipitation methods and redissolved in chloroform.

B3. Ligand exchange against PEO-PEI copolymer for  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles: We extended a procedure recently published by our group<sup>11</sup> for CdSe/CdS nanoparticles to  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocrystals. Before the transfer procedure the particles were washed two times with 20 mL methanol, centrifuged and redispersed in chloroform, followed by an addition of 50 mg oleylamine. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and washed once more with methanol.

To a dispersion of about 5 mg of the as prepared nanoparticles in 0.5 mL chloroform 2 mL of a chloroform solution containing 100 mg polymer was added. The particles were then precipitated out by adding hexane and centrifuged at 4500 rpm. Finally they were dispersed in water.

B4. Embedding of manganese doped iron oxide nanoparticles into amphiphilic polymer shell: A solution of poly(maleic anhydride-alt-1-tetradecene) in chloroform was added to a solution of the as-prepared nanocrystals in chloroform, so that 100 monomer units of the polymer were added per  $\text{nm}^2$  surface of the oleic acid/oleylamine capped particles. The mixture was then quickly sonicated and dried in a rotary evaporator, redissolved in a solution of bis(6-amino hexyl)amine in chloroform (10 molecules per  $\text{nm}^2$  particle surface) and dried again. The product was finally dissolved in a slightly alkaline Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer and used without further purification.

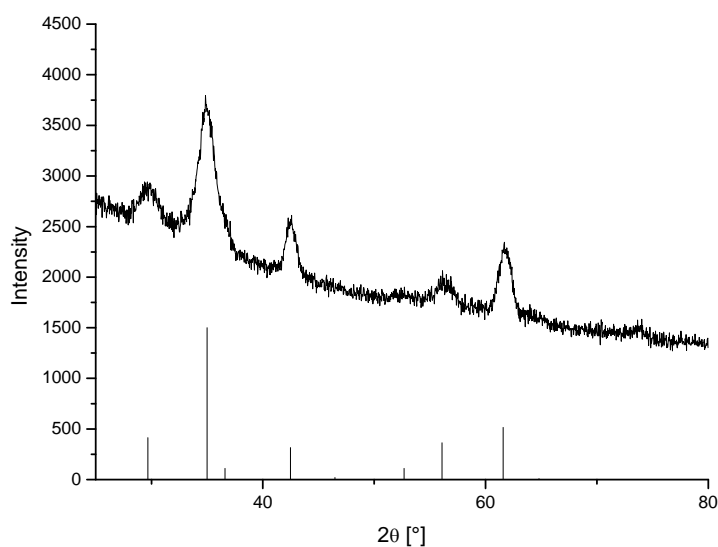
B5. Embedding of nanoparticles in lipid micelles: Particles were inserted into micelles consisting of 78.4 % 1,2,3-tri-(cis,cis-9,12-octadecadienoyl)glycerol, 19.6 % 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 2 % 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine in a liposome buffer (30.5 g 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol at pH 8.0 with acetic acid in 1 L deionized water. Particles were mixed with 40.8 mg lipids in chloroform, dried and dispersed in 4 mL liposome buffer by vigorous sonication. The dispersion was then centrifuged in order to finally precipitate non-embedded residual nanoparticles. The upper part of the slightly brown colored supernatant was redissolved in the liposome buffer.

Alternatively particles were inserted into micelles of a lipid composition extracted from chylomicrons of a hyperlipemic patient. The dried film of the lipid nanoparticle mixture was dispersed in a liposome buffer (10 mg lipid / mL) by vigorous sonicating. In difference to the first preparation technique aggregates and non-embedded residual nanoparticles were removed by filtration with a 450 nm filter (Millipore).

The size of micelles was determined by dynamic light scattering. They had a hydrodynamic diameter of approximately 250 nm with broad size distribution.

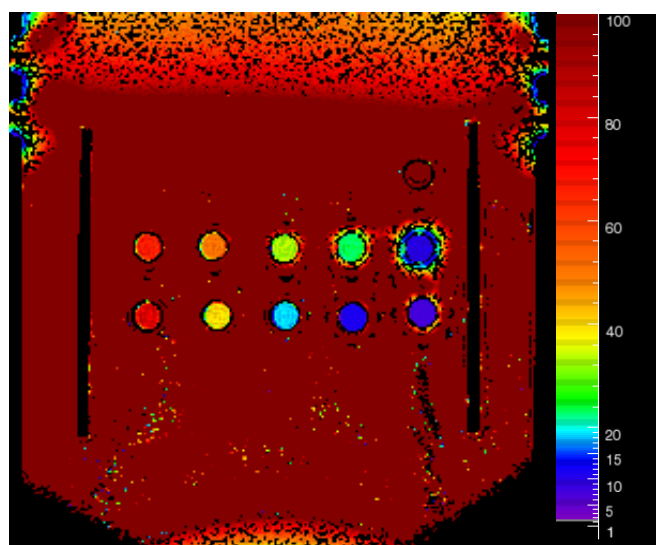
### C. Characterisation of nanoparticles

C1. X-ray diffraction data: XRD analysis indicated characteristic reflexes of cubic spinel structure.



**Figure S1.** XRD pattern of 9 nm MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals showing the typical reflexes of a cubic spinel structure. The reference reflexes for MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ICSD-PDF 73-1964) are also shown.

C2. MRI measurements: MRI measurements were carried out on a concentration series of a given sample. Relaxivities were obtained by plotting the relaxation rates ( $R_i=1/T_i$ ) against ion concentration which was determined by AAS.



**Figure S2.** T2 relaxation times (ms) for different concentrations of nanoparticles in aqueous solution (above series) and commercially available contrast agent Resovist® (concentration series below).

C3. Transverse relaxivities ( $r_2$  and  $r_2^*$ ) of all investigated samples.

<i>Coating</i>	<i>NP size (nm)</i>	$r_2$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$r_2^*$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
PEO-PEI exchange	3	43	52
PEO-PEI exchange	9	57	59
PEO-PEI exchange	18	107	120
Encapsulated	4.5	32	36
Encapsulated	6	53	62
Encapsulated	7.5	77	91
Micelles	4.5	94	803
Micelles	6	122	825
Micelles	7.5	196	665
Micelles	9	167	307
<b>Resovist</b>		260	270

**Table S1.** Transverse relaxivities with respect to the concentration of paramagnetic ions of samples of different sized nanoparticles with different polymer shell and micelles obtained by embedding nanoparticles in the hydrophobic inner part.



# **Nanocrystals for real time MR imaging and quantification of lipoprotein metabolism *in vivo***

Oliver T. Bruns<sup>1\*</sup>, Harald Ittrich<sup>2</sup>, Kersten Peldschus<sup>2</sup>, Michael G. Kaul<sup>2</sup>, Ulrich I. Tromsdorf<sup>3</sup>, Joachim Lauterwasser<sup>1</sup>, Marija S. Nikolic<sup>3</sup>, Birgit Mollwitz<sup>1</sup>, Martin Merkel<sup>1,4</sup>, Nadja C. Bigall<sup>5</sup>, Sameer Sapra<sup>5</sup>, Rudolph Reimer<sup>6</sup>, Heinz Hohenberg<sup>6</sup>, Horst Weller<sup>3</sup>, Alexander Eychmüller<sup>5</sup>, Gerhard Adam<sup>2</sup>, Ulrike Beisiegel<sup>1</sup>, Joerg Heeren<sup>1</sup>

1. IBM II: Molecular Cell Biology  
University Medical Center Hamburg-Eppendorf  
Martinistrasse 52  
D-20246 Hamburg, Germany

2. Department of Diagnostic and Interventional Radiology  
University Medical Center Hamburg-Eppendorf  
Martinistrasse 52  
D-20246 Hamburg, Germany

3. Institute of Physical Chemistry  
University of Hamburg  
Grindelallee 117  
D-20146 Hamburg, Germany

4. Asklepios Clinic St. Georg  
1. Department of Internal Medicine  
Lohmuehlenstrasse 5  
D-20099 Hamburg, Germany

5. Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry  
TU Dresden  
Bergstrasse 66b  
D-01062 Dresden, Germany

6. Department of Electron Microscopy and Micro Technology  
Heinrich-Pette Institute  
Martinistrasse 52  
D-20251 Hamburg, Germany

\*Correspondence to Oliver Bruns  
IBM II: Molecular Cell Biology  
University Medical Center Hamburg-Eppendorf  
Martinistrasse 52  
D-20246 Hamburg, Germany  
tel +49-40-42803 3917  
fax +49-40-42803 4592  
o.bruns@uke.uni-hamburg.de

**ABSTRACT**

Semiconductor quantum dots (QD) and superparamagnetic iron-oxide nanocrystals (SPIO) have exceptional physical properties that are well-suited for biomedical imaging. Previously, we showed that SPIO embedded within lipid core of micelles exhibited optimized characteristics for quantitative imaging. Here we show that by embedding QD and SPIO in the core of lipoproteins - which are micelles that transport lipids and other hydrophobic substances in the blood - it is possible to image and quantify the kinetics of lipoprotein metabolism *in vivo* non-invasively using fluorescence and dynamic magnetic resonance imaging. The lipoproteins were taken up by liver cells in wild-type mice and displayed defective clearance in knock-out mice lacking lipoprotein receptor or its ligand, indicating that the nanocrystals did not influence the specificity of the metabolic process.

This strategy can be used to study clearance of lipoproteins in metabolic disorders and to improve the contrast in clinical imaging.

Magnetic resonance imaging (MRI) is a powerful technique for medical imaging of soft tissues. The physical phenomenon underlying MRI is relaxation of protons in a static magnetic field after application of an excitation pulse. There are two different relaxation mechanisms, the spin-lattice relaxation with the relaxation time  $T_1$  and the spin-spin-relaxation with the relaxation times  $T_2$  and  $T_2^*$ . To improve the visibility of pathologic aberrations contrast agents are applied to shorten the relaxation times. Besides positive contrast agents causing a faster spin-lattice relaxation, superparamagnetic iron-oxide nanocrystals (SPIO) accelerating spin-spin relaxation are used as negative contrast agents for clinical MRI<sup>1</sup>. The relaxivities termed  $r_1$ ,  $r_2$  and  $r_2^*$  describe their efficiency to shorten a certain relaxation time<sup>2</sup>. They are not constant but strongly depend on their micro-environment, e.g. SPIO uptake into cells dramatically increases their  $r_2^*$  relaxivity<sup>3,4</sup>. Therefore, MR signal changes are caused not only by SPIO organ uptake but also by subsequent SPIO enrichment within cellular structures preventing the accurate quantification of SPIO uptake kinetics. The behaviour of concentrated SPIO is theoretically described by the static dephasing regime<sup>5</sup> in which  $r_2^*$  relaxivity reaches a constant and maximized level. Recently we have shown that it is possible to adjust the relaxivities to the static dephasing regime by embedding SPIO within the lipid core of micelles<sup>6</sup>. These SPIO-nanosomes exhibited constant and maximized  $r_2^*$  relaxivity, which is in contrast to free, non-adjusted SPIO, and therefore allow quantification of organ uptake kinetics. In addition to SPIO, quantum dots (QD) can also be incorporated within micelles to form QD-nanosomes. Since they exhibit narrow emission and broad excitation spectra combined with an exceptional photostability, QD have been applied by several investigators for fluorescence-based biomedical imaging<sup>7-13</sup> and therefore QD-nanosomes might be well-suited to visualize lipoprotein metabolism.

Lipoproteins are micelles responsible for the transport of lipids and other hydrophobic substances like vitamins and drugs in the aqueous environment of the blood. Their associated proteins, the apolipoproteins, are important for structural integrity. They act as ligands for lipoprotein receptors and thereby influence the half-life of lipoproteins within the plasma. The main classes of plasma lipoproteins are high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL) as well as very-low-density lipoproteins and chylomicrons, which both are triglyceride-rich lipoproteins (TRL). Next to high LDL and low HDL levels, an increased concentration of plasma TRL has been acknowledged as independent risk factors for cardiovascular disease<sup>14,15</sup>. LDL and HDL-like micelles enriched with hydrophobic gadolinium chelates have been used as contrast agent for the detection of tumors and

atherosclerotic plaques<sup>16-18</sup>. However, hydrophobic gadolinium chelates are characterized by severe long-term toxicity<sup>19</sup> and low relaxivity compared to SPIO<sup>16,17</sup>. Therefore, lipoproteins enriched with these kinds of paramagnetic ions are not feasible for quantitative dynamic measurements of lipoprotein metabolism.

While both LDL and HDL exhibit plasma half-life times of hours and days, respectively, postprandial TRL reveal a half-life of a few minutes<sup>20,21</sup>. For this reason comprehensive investigations of TRL metabolism remain challenging. After secretion into the bloodstream TRL are immediately converted by the hydrolytic activity of the enzyme lipoprotein lipase to smaller remnant particles<sup>22</sup>. Lipoprotein lipase remains associated with these remnants which simultaneously become enriched with HDL-derived apolipoprotein E. Both lipoprotein lipase and apolipoprotein E then facilitate the rapid internalization of remnants into the liver<sup>23-25</sup>. To understand the pathway of TRL, metabolic and kinetic studies have been performed with radioactive and stable isotopes in mice and humans<sup>26-28</sup>. However, these techniques do not allow the direct analysis of fast metabolic pathways by real-time imaging of tissue uptake. Here we demonstrate for the first time that QD- and SPIO-nanosomes can be applied to visualize TRL metabolism by fluorescence and electron microscopy as well as to quantify lipoprotein uptake kinetics non-invasively by dynamic MRI.

## **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF QD- AND SPIO-NANOSOMES**

The general composition of different QD- and SPIO-nanosomes employed in the current study is presented by the schematic in Fig. 1. For the direct quantification of SPIO-nanosomes uptake, the lipid core of SPIO-nanosomes was in some experiments additionally radiolabeled with <sup>3</sup>H-cholesteryl oleyl ether. To obtain a model for TRL, nanosomes were functionalized by associating apolipoprotein E and lipoprotein lipase with QD- or SPIO-nanosomes. Both proteins can act as ligands for lipoprotein receptors on the cell surface and mediate uptake of TRL<sup>23,29</sup>.

The applied hydrophobic CdSe/CdS/ZnS-core-shell-shell QD and iron oxide based SPIO nanocrystals have a diameter of 5 nm and 6 nm, respectively, and show a narrow size distribution with a standard deviation smaller than 10% (Fig. 2a and 2b). A lipid extract from human TRL was prepared to obtain a physiological lipid composition for the generation of QD- (Fig. 2c and d) and SPIO- (Fig. 2g) nanosomes. As determined by dynamic light scattering both QD- and SPIO-nanosomes have a diameter of approximately 250 nm (data not shown). The distribution of the nanocrystals within the nanosomes was analyzed in a previous

study by electron microscopy and revealed that both QD and SPIO are located within the hydrophobic core of nanosomes<sup>8</sup>. Size exclusion gel chromatography and subsequent lipid analysis indicated a typical composition of TRL (see Supplementary Information, Figs. 1 and 4 for QD- and SPIO-nanosomes, respectively). QD-nanosomes are characterized by narrow emission and broad reflexion spectra both comparable to spectra of pure QD (Fig. 2e and f; see Supplementary Information, Fig. 2). The magnetization curves of SPIO powder and SPIO-nanosomes are identical and both showed no hysteresis which is characteristic for superparamagnetic nanocrystals (Fig. 2h). In summary, the characterization of both QD- and SPIO-nanosomes validated that optical as well as magnetic properties of QD- and SPIO-nanocrystals are not altered by the embedding procedure.

### **DETECTION OF NANOSOMES *IN VITRO***

To investigate specific uptake of QD-nanosomes into liver cells they were functionalized with apolipoprotein E and lipoprotein lipase. Protein association with nanosomes was confirmed by size exclusion gel chromatography and subsequent fluorescence detection of QD-nanosomes or magnetic pull-down of SPIO-nanosomes followed by detection of apolipoprotein E and lipoprotein lipase using immuno-blotting analysis (see Supplementary Information, Figs. 1 and 4). The uptake of functionalized QD-nanosomes was studied in primary murine hepatocytes (Fig. 3a-b) and human hepatoma cells (Supplementary Information, Fig. 3). In comparison to pure QD-nanosomes, the association of apolipoprotein E and lipoprotein lipase lead to an increased uptake of QD-nanosomes into endosomal compartments indicating lipoprotein receptor mediated endocytosis.

Similar results were obtained with radiolabeled SPIO-nanosomes (Fig. 3c). In this experiment, apolipoprotein E alone (1.4-fold) and in coordinate way apolipoprotein E and lipoprotein lipase (1.7-fold) significantly increased the internalization compared to pure radiolabeled SPIO-nanosomes.

The incorporation of nanocrystals into micelles to generate SPIO-nanosomes could potentially alter functional properties in comparison to pure SPIO-free micelles making our approach inappropriate to follow lipoprotein metabolism. To exclude this possibility, inhibition experiments with SPIO-free micelles functionalized with apolipoprotein E were performed. The addition of functionalized SPIO-free micelles significantly reduces the amount of functionalized radiolabeled SPIO-nanosomes in a dose-dependent way (Fig. 3d). Thus, SPIO embedded in SPIO-nanosomes did not influence ligand binding properties of apolipoprotein E. Taken together, QD- as well as SPIO-nanosomes were only efficiently and

specifically internalized in the presence of apolipoprotein E and lipoprotein lipase indicating that nanosomes can be functionalized by apolipoproteins which allows the specific targeting to hepatic lipoprotein receptors.

### **DETECTION OF NANOSOMES *IN VIVO***

In order to transfer the *in vitro* data to the *in vivo* situation, we investigated the clearance of QD- as well as SPIO-nanosomes in wildtype mice. In the blood nanosomes are hydrolyzed by lipoprotein lipase and during this process become enriched with endogenous apolipoprotein E and lipoprotein lipase<sup>23,25</sup>. Since lipoprotein lipase-mediated hydrolysis could potentially induce the release of SPIO from SPIO-nanosomes, it was necessary to confirm that SPIO remain embedded in nanosomes after hydrolysis. Therefore, SPIO-nanosomes were incubated in the absence and presence of active lipoprotein lipase and centrifuged to separate intact SPIO-nanosomes from potentially released free SPIO (Supplementary Information, Fig. 5). After lipase-mediated hydrolysis an enrichment of iron in relation to triglycerides was observed in re-isolated SPIO-nanosomes indicating that SPIO remained incorporated within the hydrophobic core of nanosomes while triglyceride-derived fatty acids are released.

The intravenous injection of SPIO-nanosomes into wildtype mice caused a strong signal decay in  $T_2^*$ -weighted MR-images (Fig. 4a and Supplementary Information, Fig. 6). This was most obvious in the liver, the organ which is known to be most important for TRL clearance<sup>22,23,30</sup>. In line with the described biodistribution for TRL uptake<sup>30,31</sup>, other tissues such as the skeletal muscle or adipose tissue showed no signal changes.

To follow the uptake of QD-nanosomes on the cellular level, QD- and SPIO-nanosomes were intravenously injected into wildtype mice and then the liver was processed for cryosectioning. QD-nanosomes generated strong fluorescence signals associated with hepatocytes, which could be clearly distinguished from the background by using three different excitation wavelengths (Figs. 4b-d). Fluorescence signals were detected at the surface and within cells with the typical polygonal shape characteristic for hepatocytes. Furthermore, we investigated the cellular uptake of internalized SPIO-nanosomes by electron microscopy. SPIO-nanosomes were internalized predominantly by hepatocytes (Fig. 4e) and not by phagocytotic Kupffer cells. This is distinct from the uptake of clinically applied SPIO like Resovist<sup>®</sup> and Endorem<sup>®</sup> as well as surface-modified lipoproteins such as oxidized VLDL, which are captured in Kupffer cells after intravenous injection<sup>32,33</sup>. As highlighted by the arrows in the inset of Fig. 4e, SPIO of internalized nanosomes are targeted to the periphery of lipid droplets within the

hepatocytes suggesting that the hydrophobic core of internalized TRL is targeted to lipid stores *in vivo*.

### NON-INVASIVE MRI QUANTIFICATION OF UPTAKE KINETICS

To obtain an estimate of the quantitative organ distribution of SPIO-nanosomes as basis to calculate the SPIO-derived iron concentration in the liver, wild type mice were injected with radiolabeled SPIO-nanosomes (Fig. 5a). This particular radiolabel is trapped intracellularly and cannot be re-secreted and therefore the measured radioactivity represents in fact internalized SPIO-nanosomes. In agreement with previous findings analyzing the plasma clearance of TRL or micelles<sup>23,31</sup> 20 min after the injection of radiolabeled SPIO-nanosomes approximately 50% of the injected dose were found associated with the liver. Other organs internalized minor amounts of SPIO-nanosomes (adipose tissue 6.7%, spleen 2.4%; muscles 1.8 %, heart 0.9% and kidneys 0.4% of the injected dose).

To determine the  $r_2^*$  relaxivity in the liver *in vivo* the SPIO-derived iron levels were correlated to the change in the relaxation rate ( $\Delta R_2^*$ ) before and 20 min after the injection of SPIO-nanosomes. Hepatic iron levels are physiologically already high and so the injection of SPIO-nanosomes did not lead to a measureable increase in hepatic iron concentration (data not shown). Therefore, the iron concentration of the SPIO-nanosomes was determined and used to estimate the increase of hepatic SPIO-derived iron after accumulation of nanosomes (see formula in Supplementary Information, Methods). After the injection of different SPIO-nanosomes dilutions these estimates were used to directly correlate the change in  $r_2^*$  with SPIO-derived iron levels (Fig. 5b). A linear association between the relaxation rate change in  $T_2^*$  and iron concentration was observed allowing us to determine the  $r_2^*$  relaxivity of SPIO-nanosomes in the liver. *In vivo*, the  $r_2^*$  relaxivity in the liver was approximately  $850 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  after the injection of SPIO-nanosomes. *In vitro*, the longitudinal and transversal relaxivities of SPIO-labeled nanosomes at  $37^\circ\text{C}$  were for  $r_1 = 2.5 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , for  $r_2 = 410 \pm 46 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $r_2^* = 800 \pm 64 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The difference between  $r_2$  and  $r_2^*$  values indicates that the  $r_2^*$ -relaxivity of nanosomes are described by the static dephasing regime as reported previously<sup>3,6,34,35</sup>. Furthermore, as predicted by the static dephasing regime, the  $r_2^*$  relaxivity of SPIO-nanosomes observed *in vivo* is in a good agreement with the *in vitro* measurements. Thus, maximally enhanced  $r_2^*$  relaxivity of concentrated SPIO in the lipid core of SPIO-nanosomes is preserved *in vivo* allowing us to quantify uptake kinetics of TRL by dynamic MRI. Observed relaxivities were higher than those of optimized  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -nanocrystals used for ultra-sensitive molecular imaging<sup>36</sup> or for microparticles of iron-oxide used for the early

detection of brain inflammation<sup>37</sup> and single cells<sup>38</sup>. Interestingly, the  $r_2^*$ -relaxivity was more than three times higher than that of commercial available clinical contrast agent Resovist<sup>®</sup> measured with the same experimental setup.

In order to directly quantify the kinetics of lipoprotein turnover in the living animal dynamic MRI was employed. Therefore, transversal images of the abdomen containing the liver, the stomach and the major abdominal vessels (aorta, inferior vena cava and portal vein) were consecutively taken every 5.5 seconds. After recording a series of non-contrast images, SPIO-nanosomes were intravenously injected via a tail-vein catheter while continuing the imaging procedure (Fig. 6a, see also Supplementary Information, Movie and Fig. 7). The injected dose lead to a maximum increase of 100 mg/dl in plasma triglyceride levels, which are within the physiological range for TRL after having a meal<sup>23,39</sup>. Directly after the injection a massive decrease of the MRI signal was observed in the vena cava (see arrow at 5.5 sec, Fig. 6a). Then the major vessels of the liver became contrasted (see arrows at 11 sec), followed by a continuous signal decrease of the liver (see arrows at 16.5 sec). After 38.5 seconds the MRI signal of the blood was increasing again (see arrows at 38.5 sec to 126.5 sec) whereas the liver remained dark. This indicates clearance of SPIO-nanosomes from the bloodstream by the liver.

The dynamic non-invasive detection of hepatic lipoprotein uptake is shown for four individual wild type mice (Fig. 6b) and demonstrates the reproducibility of the technique. The initial association process was very fast (>80% of the association occurred within the first two minutes) and followed a two phase exponential association kinetic which has been proposed from analyzing the plasma clearance of radiolabeled lipoproteins in mice<sup>40,41</sup>. The procedure enables us to record 150 data points for hepatic lipoprotein clearance non-invasively for an individual animal within 15 minutes. This is in contrast to metabolic studies using radioactive isotopes to determine the organ uptake where one data point normally corresponds to one animal.

To test whether this technique is suitable to detect quantitative differences in hepatic uptake, liver clearance of SPIO-nanosomes was compared between wildtype, apolipoprotein E-deficient and LDL-receptor deficient mice. Due to the lack of the LDL-receptor or its ligand apolipoprotein E, both mutant mice strains are characterized by a reduced hepatic uptake of TRL compared to wildtype mice<sup>31,42</sup>. The comparison of SPIO-nanosomes turnover in wildtype, apolipoprotein E-deficient and LDL-receptor-deficient mice confirmed the reduced liver uptake (Fig. 6c and 6d) indicating that SPIO-nanosomes are specifically internalized in an apolipoprotein E-dependent manner via lipoprotein receptor mediated endocytosis *in vivo*.



Studies using radiolabeled TRL or micelles found a more pronounced defect in the particle clearance in mice lacking apolipoprotein E or the LDL-receptor<sup>31,43,44</sup>. This is probably explained by the fact that our non-invasive technique cannot differentiate between the accumulation of particles within the space of Disse and the internalization by hepatocytes<sup>29</sup>.

## CONCLUSION

Here we describe a new method to visualize and quantify organ uptake of lipoproteins *in vivo* by MRI in real time. This approach includes embedding of hydrophobic QD- or SPIO-nanocrystals in the lipid core of lipoproteins to generate QD- as well as SPIO-nanosomes. This is a very gentle way to utilize nanocrystals without applying complex surface modification steps usually necessary for bioimaging and preserves the extraordinary quality of nanocrystals. In addition, a great advantage of this procedure is that only the hydrophobic core is labeled while the biological relevant surface structure remains unaltered. This is an important issue because surface modification of lipoproteins changes their binding properties to cells and thereby leads to altered uptake kinetics<sup>33,45</sup>. Thus, SPIO-nanosomes allow studying physiological lipoprotein metabolism. Most importantly, the combined time and spatial resolution of dynamic MRI have not been achieved with any other previously reported technique to study TRL clearance. Maximized  $r_2^*$ -relaxivity of embedded SPIO and their high electron density enabled us to combine MRI with microscopic techniques to visualize TRL metabolism non-invasively and to follow the cellular processing of SPIO-nanosomes. In principle, the quantification of lipoprotein metabolism *in vivo* using a 3-Tesla MR scanner is adaptable to a clinical setting. Therefore, this method can lead to an improved understanding of metabolic disorders.

## METHODS

### Synthesis and characterization of QD- and SPIO-nanosomes

Human TRL were isolated by ultracentrifugation and lipid concentrations were determined using commercial kits (Roche)<sup>23</sup>. Then, 5 mg of lipids were extracted using 1 ml of chloroform / methanol (2:1 v/v) by vigorous shaking. Apolipoproteins were pelleted by centrifugation at 18.000 g for 10 min. Supernatants were harvested and the solvent was removed under an ambient flow of nitrogen. For embedding 10 mg of the lipid extract (approximately 80% triglycerides; 10% cholesterol and 10% phospholipids) were dissolved in

chloroform and mixed with either 0.5 mg iron-oxide nanocrystals or 1.25 nmol CdSe/CdS-core-shell or CdSe/CdS/ZnS-core-shell-shell nanocrystals, respectively. To obtain radiolabeled SPIO-nanosomes  $^3\text{H}$ -cholesterol-oleyl ether was added to the lipid extract (5  $\mu\text{Ci}$ , 10 mg lipids, 0.5 mg iron-oxid nanocrystals). The solvent was removed and nanosomes were formed by sonication for 10 min at 60°C in 1 ml of PBS or Tris buffer. Aggregates were removed by filtration using a 450 nm filter (Millipore). The hydrodynamic diameter of nanosomes was determined by dynamic light scattering (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS). The integrity and structure were analyzed by electron microscopy and in case of QD and QD-labeled nanosomes also by emission (Fluoro-Log, Instruments SA), absorption (Cary 100, Varian) and reflexion spectra (Cary 500, Varian equipped with a Ulbricht-Sphere, Labsphere). Magnetic measurements of SPIO were carried out using a Foner sample vibration magnetometer (Princeton, Model 155).

### ***In vivo* uptake studies and organ distribution**

For *in vivo* studies, 200  $\mu\text{l}$  of QD-nanosomes (5 mg/ml triglycerides, 0.625 nM CdSe/CdS/ZnS-core-shell-shell nanocrystals) were tail vein injected into wildtype FVB mice, which were fasted five hours prior to the experiment. After 60 min anaesthetized mice were perfused with 10 ml PBS-Heparin (100 U/ml) via the heart to remove surface-associated nanosomes. Organs were taken and covered with dry ice for 30 minutes. After cryosectioning overview images were taken using an inverted Axiovert100 microscope equipped with a Axiocam (Zeiss).

For electron microscopy, 200  $\mu\text{l}$  of SPIO-nanosomes (5 mg/ml triglycerides, 0.25 mg/ml SPIO) were intravenously injected into wildtype FVB mice. Anaesthetized mice were perfused as described above and organs were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS, washed, and postfixed for 30 min with 1%  $\text{OsO}_4$  in PBS. For ultrathin sectioning, the samples were gradually dehydrated with ethanol and embedded in EPON resin. Ultrathin sections were post-stained with 2% uranyl acetate and lead citrate. Electron micrographs of the liver were obtained with a MultiScan 794 camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA) and a Philips CM 120 transmission electron microscope at 80 kV.

To determine the organ distribution of SPIO-nanosomes *in vivo*, 200  $\mu\text{l}$  of  $^3\text{H}$ -cholesterol-oleyl ether radiolabeled SPIO-nanosomes (5 mg/ml triglycerides, 0.25 mg/ml SPIO, 2,000,000 cpm/ml) were tail vein injected into fasted wild type FVB mice. After 20 minutes anaesthetized mice were sacrificed. In order to compare the results to the organ distribution observed by MRI no systemic perfusion was performed. Liver, adipose tissue, spleen, muscle,

heart and kidneys were weighed and organ samples were homogenized.  $^3\text{H}$ -cholesterol-oleyl ether was measured after Dole extraction by liquid scintillation counting as described<sup>46</sup> and SPIO-nanosomes uptake was calculated as percentage of the injected dose.

### Dynamic MRI of the liver

All static and dynamic MRI measurements were performed with a clinical 3 Tesla MR scanner (Philips Medical Systems, Netherlands) equipped with a custom-made small animal solenoid coil. The dynamic measurements were based on a gradient-echo sequence (parameters are displayed in Supplementary Information, Table 1). The imaging sequence provided a voxel resolution of  $0.28 \times 0.33 \times 2 \text{ mm}^3$ . Since the voxel size can critically affect the numerical analysis, the signal to noise ratio was increased by averaging three images. This results in a temporal resolution of 5.5 seconds and a signal to noise ratio in the liver before injection of approximately 40. The applied echo time of the sequence was optimized with respect to the sensitivity to detect a concentration change.

The applied sequence is highly sensitive to susceptibility effects caused by local magnetic field inhomogeneities which can be artificially produced by the use of paramagnetic or superparamagnetic contrast agents. In consequence, the kinetics of application and distribution of a contrast agent can then be imaged *in vivo* by measuring dynamic time series. For negative contrast agents like nanosomes a signal drop is observed. From the physics point of view the nanosomes are speeding up the dephasing of the transversal magnetic information by their high  $r_2^*$ -relaxivity. DICOM data from the dynamic measurements were processed with ImageJ<sup>47</sup>. Regions of interest were placed in the liver and the vena cava and intensities of every single image in a time series  $S(t)$  were exported and normalized to the average intensity  $S_0$  contrast before SPIO-nanosomes injection. It is assumed that the change in  $S(t)$  is mainly obtained by  $T_2^*$  relaxation due to the high relaxivity  $r_2^*$  ( $=800 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$ ). Effects of  $T_1$  relaxation play a minor role due to the differential analysis approach and the low  $r_1$  relaxivity of the nanosomes ( $r_1 = 2.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$ ). Then the change of the relaxation rate  $R_2^* = (1/T_2)$  can be calculated by  $\Delta R_2^* = -\ln(S(t)/S_0)/TE$ . This measure scales linearly with the nanosome concentration  $\Delta C = \Delta R_2^*/r_2^*$  when  $r_2^*$  relaxivity does not change during the measurement process. The kinetics of hepatic uptake were compared in wildtype, apolipoprotein E- and LDL receptor deficient mice after the injection of 200  $\mu\text{l}$  SPIO-nanosomes (5 mg/ml triglycerides for Fig. 6a-c; 1.25 mg/ml triglycerides for Fig. 6d)

Further detailed methodology describing the synthesis and characterization of nanocrystals, the *in vitro* studies and relaxivity measurements are included (Supplementary Information, Methods).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Schematic illustration of pure and functionalized QD- and SPIO-nanosomes.**

**Figure 2: Characterization of nanocrystals, QD- and SPIO-nanosomes**

Electron microscopy image of highly monodisperse QD (a) and SPIO (b). Inset shows magnified view. c, Triglyceride-rich QD-nanosomes embedded with nanocrystals are turbid due to the scattering of nanosomes. d, According to the size of the QD, UV-excitation illuminate the QD-nanosomes green (540 nm; CdSe core size ~2.7 nm), yellow (570 nm; CdSe core size ~3.3 nm) and red (600 nm; CdSe core size ~4.2 nm), respectively. The fluorescence spectra of the three nanocrystals dissolved in chloroform (e) and after the incorporation into nanosomes in water (f) are nearly identical. g, Solution of SPIO-nanosomes (left) can be pulled down using a magnet (right). h, Magnetization curves of SPIO powder and SPIO-nanosomes.

**Figure 3: *In vitro* uptake of QD- and SPIO-nanosomes.**

Confocal image of primary hepatocytes incubated for 60 min at 37°C with pure QD-nanosomes (a) and those functionalized with lipoprotein lipase and apolipoprotein E (b). Specific uptake (c) and inhibition (d) of <sup>3</sup>H-cholesterol oleyl ether radiolabeled SPIO-nanosomes. Human hepatoma cells were incubated with different SPIO-nanosomes as described above for QD-nanosomes and the radioactivity in lysed cells were measured. For inhibition experiments uptake was analyzed in the presence of functionalized SPIO-free micelles. Mean values +/- SD; n=3 (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 determined by Students T-test corrected for multiple testing (c) and by ANOVA (d).

**Figure 4: *In vivo* imaging of intravenously injected QD- and SPIO-nanosomes**

a, Transversal MR images of a wildtype mouse before (left image) and 60 min after intravenous injection of SPIO-labeled nanosomes (right image). The negative contrast indicates the association of SPIO-nanosomes with the liver. b-d, Fluorescence images of a mouse liver section excited by UV- (b), blue (c) and green (d) light 60 min post injection of QD-nanosomes. Arrows points to orange fluorescence of liver-associated QD-nanosomes. e, As determined by electron microscopy of ultrathin sectioned liver, SPIO appeared in lipid droplets inside the hepatocytes (**n** marks the nuclei, **v** the intrahepatic vessels). The inset shows a magnified view of a lipid droplet, the arrows point to nanocrystals.

**Figure 5. Biodistribution and relaxometry of SPIO-nanosomes *in vivo***

a, Biodistribution was determined 20 min after intravenous injection of  $^3\text{H}$ -cholesterol oleyl ether radiolabeled SPIO-nanosomes. Organ uptake of SPIO-nanosomes was calculated as percentage of injected dose. b, To determine the  $r_2^*$  relaxivity in the liver, the difference in  $T_2^*$  relaxation rate ( $\Delta R_2^*$ ) was measured before and 20 min after intravenous injection of increasing amounts of SPIO-nanosomes. Data were plotted in relation to the SPIO-derived iron concentration in the liver ( $R^2=0.967$  for linear regression).

**Figure 6: Quantitative real time *in vivo* imaging of hepatic lipoprotein uptake in wildtype, apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice**

FVB wildtype mice were catheterized and  $T_2^*$ -weighted images were recorded for at least 3 min before the intravenous injection of SPIO-nanosomes. a, SPIO-nanosomes diminished the blood signal (see arrow at 5.5 sec pointing to the vena cava and arrows at 11 sec pointing to hepatic vessels). SPIO-nanosomes are cleared from the blood (arrow at 38.5 sec) and simultaneously the liver becomes dark (arrows at 16.5 sec) indicating hepatic clearance. b, Time-course of hepatic SPIO-nanosomes uptake kinetics showing every single data point (n=4). Mean values of hepatic SPIO-nanosomes uptake in wildtype compared to apolipoprotein E-deficient mice (c; injected dose n=4 per group) and compared to LDL receptor-deficient mice (d; n=3 per group). Lines indicate the fitted two-phase exponential kinetics for different mouse groups, dashed lines show the 95% confidence intervals.

## REFERENCE LIST

1. Sosnovik, D.E., Nahrendorf, M. & Weissleder, R. Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine. *Circulation* **115**, 2076-2086 (2007).
2. Mulder, W.J., Strijkers, G.J., van Tilborg, G.A., Griffioen, A.W. & Nicolay, K. Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR Biomed.* **19**, 142-164 (2006).
3. Bowen, C.V., Zhang, X.W., Saab, G., Gareau, P.J. & Rutt, B.K. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn. Reson. Med.* **48**, 52-61 (2002).
4. Simon, G.H. *et al.* T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning. *Eur. Radiol.* **16**, 738-745 (2006).
5. Yablonskiy, D.A. & Haacke, E.M. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. *Magn. Reson. Med.* **32**, 749-763 (1994).
6. Tromsdorf, U.I. *et al.* Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano Lett.* **7**, 2422-2427 (2007).
7. Alivisatos, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* **22**, 47-52 (2004).
8. Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538-544 (2005).
9. Bruchez, M., Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. & Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**, 2013-2016 (1998).
10. Chan, W.C. & Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* **281**, 2016-2018 (1998).
11. Dubertret, B. *et al.* In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **298**, 1759-1762 (2002).
12. Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **22**, 969-976 (2004).
13. Kim, S. *et al.* Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* **22**, 93-97 (2004).
14. Bamba, V. & Rader, D.J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology* **132**, 2181-2190 (2007).
15. Glassberg, H. & Rader, D.J. Management of Lipids in the Prevention of Cardiovascular Events. *Annu. Rev. Med.* **59**, 79-94 (2008).
16. Frias, J.C., Williams, K.J., Fisher, E.A. & Fayad, Z.A. Recombinant HDL-like nanoparticles: a specific contrast agent for MRI of atherosclerotic plaques. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16316-16317 (2004).
17. Corbin, I.R. *et al.* Low-density lipoprotein nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Neoplasia*. **8**, 488-498 (2006).
18. Glickson, J.D. *et al.* Lipoprotein nanoplatform for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents. *Mol. Imaging* **7**, 101-110 (2008).
19. Penfield, J.G. & Reilly, R.F., Jr. What nephrologists need to know about gadolinium. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **3**, 654-668 (2007).

20. Karpe, F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **246**, 341-355 (1999).
21. Zheng, C., Murdoch, S.J., Brunzell, J.D. & Sacks, F.M. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 891-896 (2006).
22. Merkel, M., Eckel, R.H. & Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* **43**, 1997-2006 (2002).
23. Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. & Beisiegel, U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* **80**, 576-584 (2002).
24. Beisiegel, U., Weber, W. & Bengtsson-Olivecrona, G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8342-8346 (1991).
25. Mahley, R.W. & Ji, Z.S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* **40**, 1-16 (1999).
26. Martins, I.J. & Redgrave, T.G. Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? *J. Nutr. Biochem.* **15**, 130-141 (2004).
27. Chan, D.C., Barrett, P.H. & Watts, G.F. Recent studies of lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome and related disorders. *Curr. Opin. Lipidol.* **17**, 28-36 (2006).
28. Magkos, F. & Sidossis, L.S. Measuring very low density lipoprotein-triglyceride kinetics in man in vivo: how different the various methods really are. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **7**, 547-555 (2004).
29. Havel, R.J. & Hamilton, R.L. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 213-215 (2004).
30. Hussain, M.M. *et al.* Chylomicron Metabolism - Chylomicron Uptake by Bone-Marrow in Different Animal Species. *J. Biol. Chem.* **264**, 17931-17938 (1989).
31. Rensen, P.C. *et al.* Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptor versus hepatic remnant receptor in vivo. *J. Lipid Res.* **38**, 1070-1084 (1997).
32. Saini, S. *et al.* Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* **162**, 211-216 (1987).
33. de Rijke, Y.B., Hessels, E.M. & Van Berkel, T.J. Recognition sites on rat liver cells for oxidatively modified beta-very low density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 41-49 (1992).
34. Gillis, P., Moiny, F. & Brooks, R.A. On T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model. *Magn. Reson. Med.* **47**, 257-263 (2002).
35. Brooks, R.A. T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a chemical exchange model. *Magn. Reson. Med.* **47**, 388-391 (2002).
36. Lee, J.H. *et al.* Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* **13**, 95-99 (2007).
37. McAteer, M.A. *et al.* In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat. Med.* **13**, 1253-1258 (2007).
38. Shapiro, E.M. *et al.* MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10901-10906 (2004).

39. Tiret, L. *et al.* Postprandial response to a fat tolerance test in young adults with a paternal history of premature coronary heart disease - the EARS II study (European Atherosclerosis Research Study). *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 578-585 (2000).
40. Aalto-Setälä, K. *et al.* Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J. Clin. Invest.* **90**, 1889-1900 (1992).
41. Merkel, M. *et al.* Transgenic mice expressing catalytically inactive LPL in muscle have increased muscle uptake of VLDL particles. *Circulation* **98**, 591 (1998).
42. Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. The 2-Receptor Model of Lipoprotein Clearance - Tests of the Hypothesis in Knockout Mice Lacking the Low-Density-Lipoprotein Receptor, Apolipoprotein-E, Or Both Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4431-4435 (1994).
43. Herz, J. *et al.* Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4611-4615 (1995).
44. Mortimer, B.C., Beveridge, D.J., Martins, I.J. & Redgrave, T.G. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE-deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 28767-28776 (1995).
45. Nagelkerke, J.F., Havekes, L., van Hinsbergh, V.W. & Van Berkel, T.J. In vivo catabolism of biologically modified LDL. *Arteriosclerosis* **4**, 256-264 (1984).
46. Merkel, M. *et al.* Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* **277**, 7405-7411 (2002).
47. Rasband, W.S. ImageJ. National Institutes of Health. Computer Program (2006)

### Acknowledgements

We thank A. Laatsch, R. Fischer and A. Bartelt for helpful discussions. K. Cornils, B. Holstermann, M. Warmer, S. Ehret and R. Kongi for excellent technical assistance, A. Kornowski for electron microscopy images and R. Capek for providing QD. O.T.B. is supported by a fellowship from the Studienstiftung des Deutschen Volkes. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to J.H., U.B. and A.E. (HE3645/2-2; BE829/10-1 and EY16/9-1).



**Author Contributions**

O.T.B performed and was involved in all aspects of the experiments. O.T.B, U.B. and J.H. designed the study. H.I., K.P., M.G.K. and G.A. performed MRI measurements. U.I.T., N.C.B., M.S.N., S.S., A.E. and H.W. were responsible for synthesis and characterization of nanocrystals. R.R. and H.H. are responsible for electron microscopy. O.T.B, U.I.T., U.B. and J.H. co-wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

**Abbreviation list**

HDL: high density lipoproteins; LDL: low density lipoproteins; MRI: magnetic resonance imaging; QD: quantum dots; SPIO: superparamagnetic iron-oxide nanocrystals; TRL: triglyceride-rich lipoproteins

**Competing interest statement**

The authors declare no competing financial interests.

**Author Information**

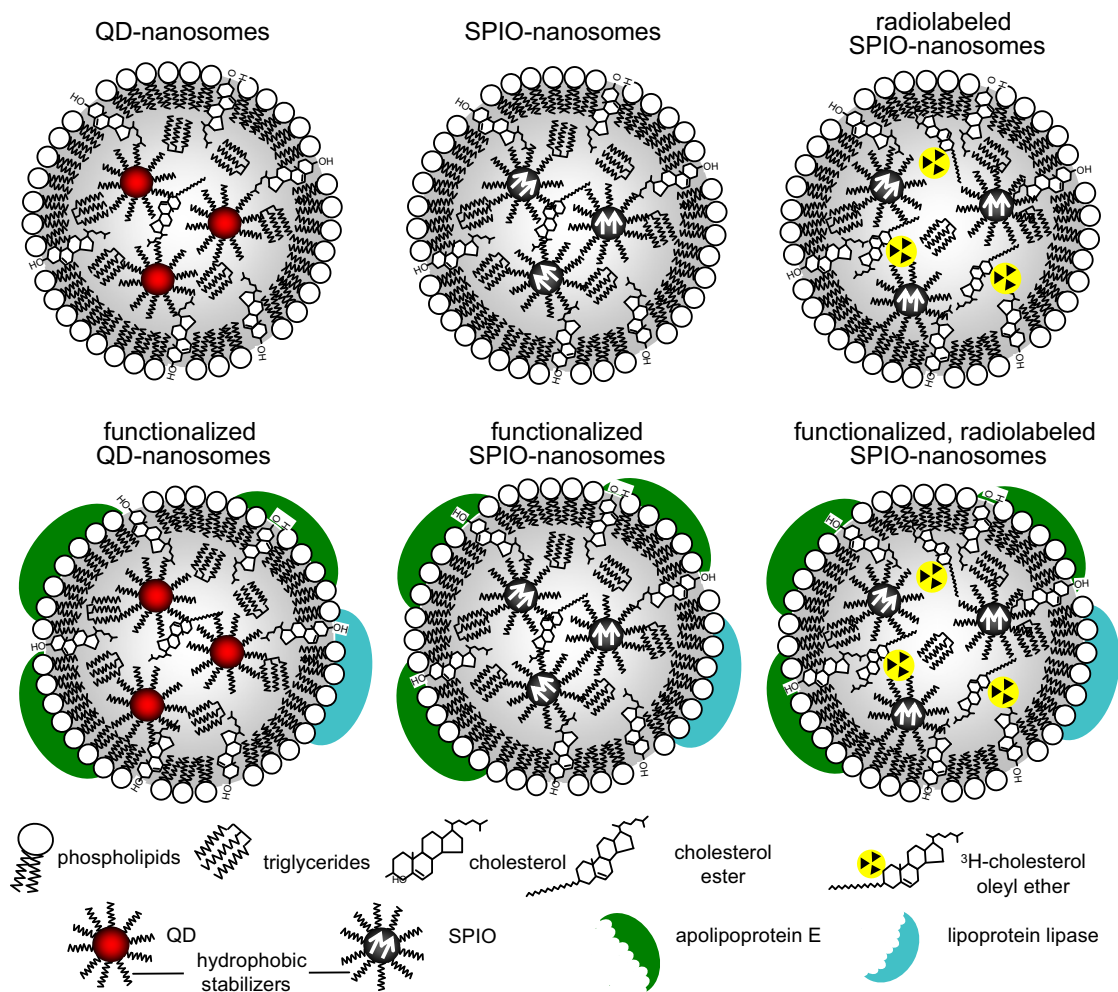
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T.B.

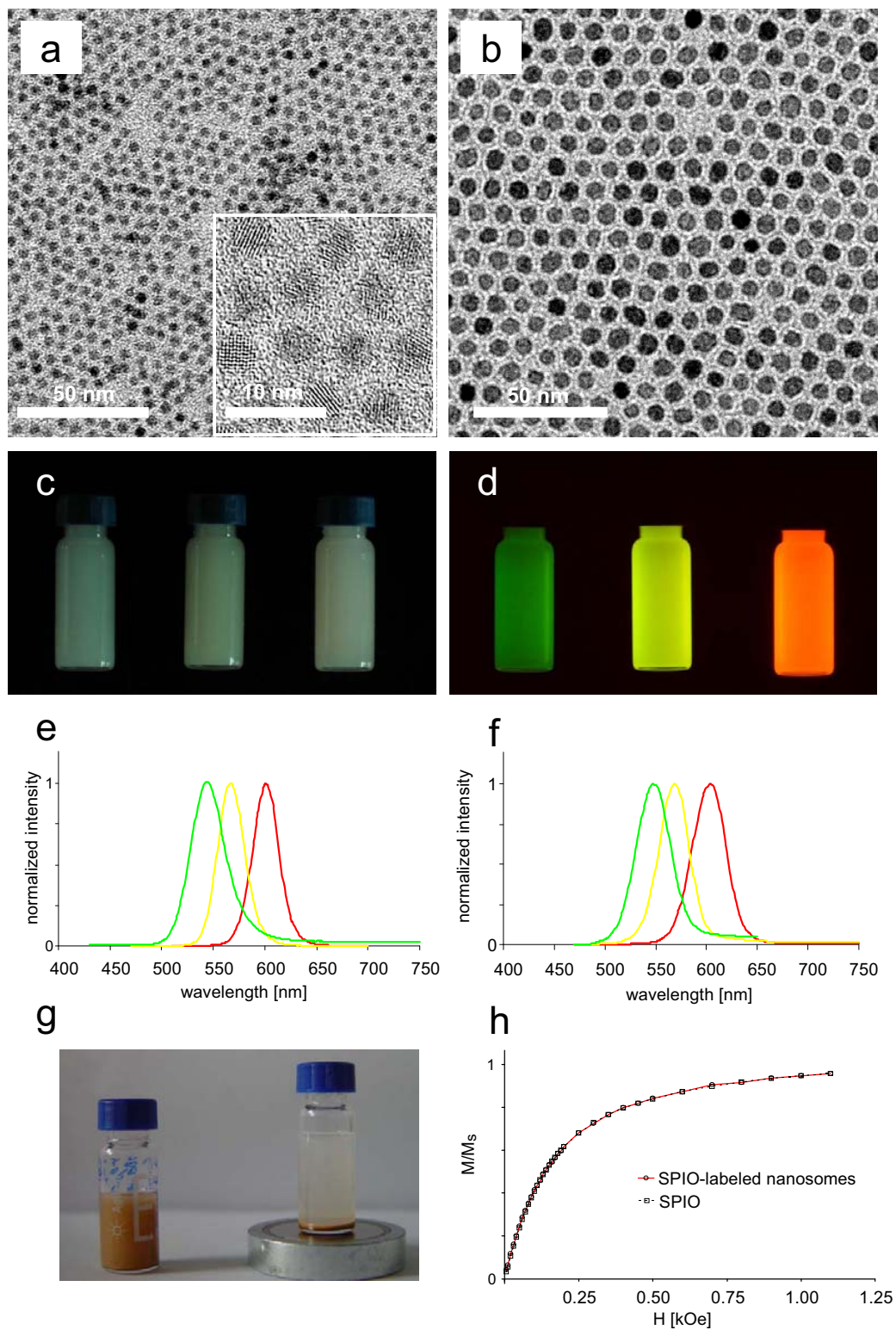
**Summary of paper for the website**

Quantum dots and superparamagnetic iron-oxide nanocrystals embedded in lipoproteins can be used to image and quantify the kinetics of lipid metabolism *in vivo* non-invasively using fluorescence and dynamic magnetic resonance imaging. This strategy can be used to study clearance of lipoproteins in metabolic disorders and to improve the contrast in clinical imaging.

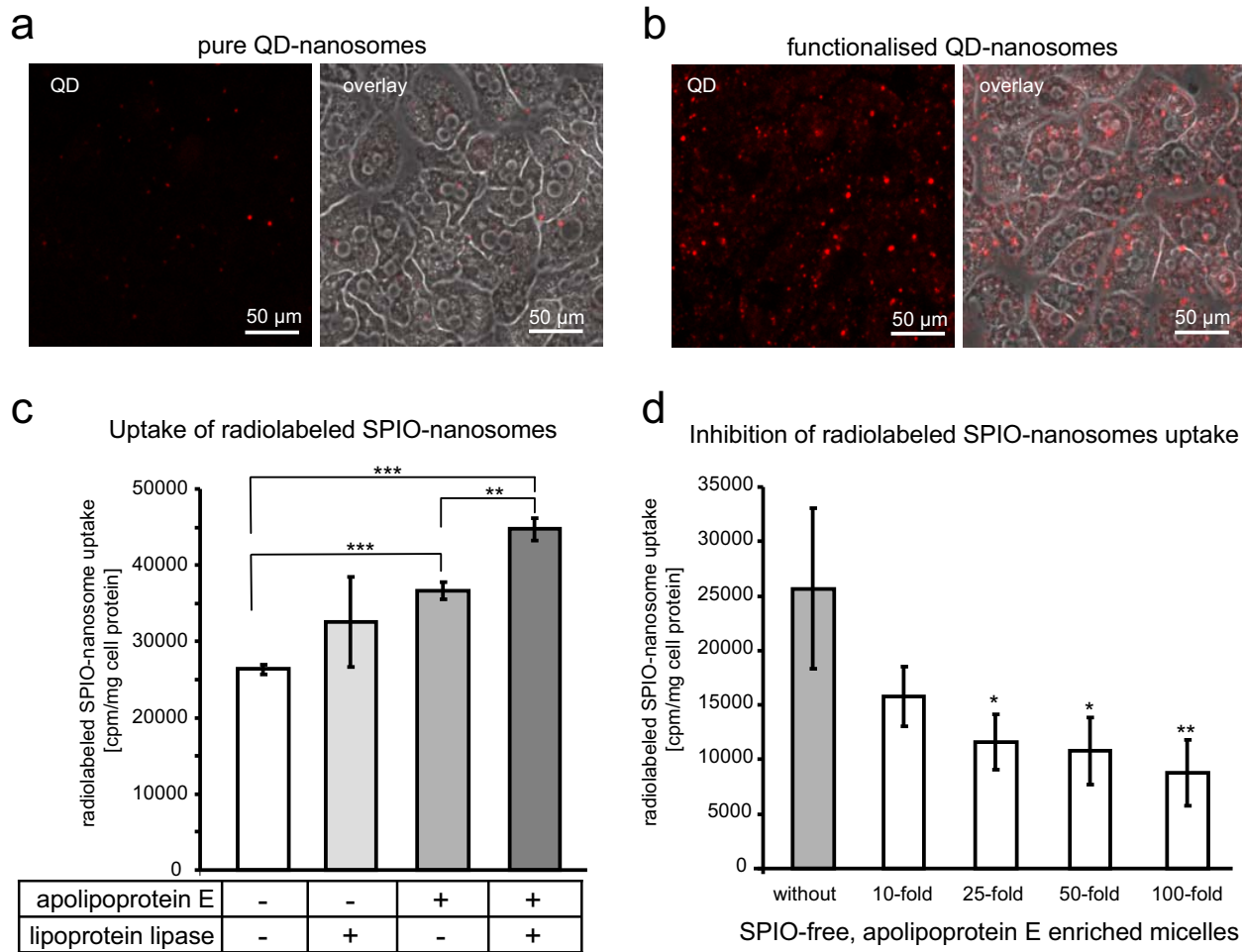
Bruns et al., 2008  
 Figure 1



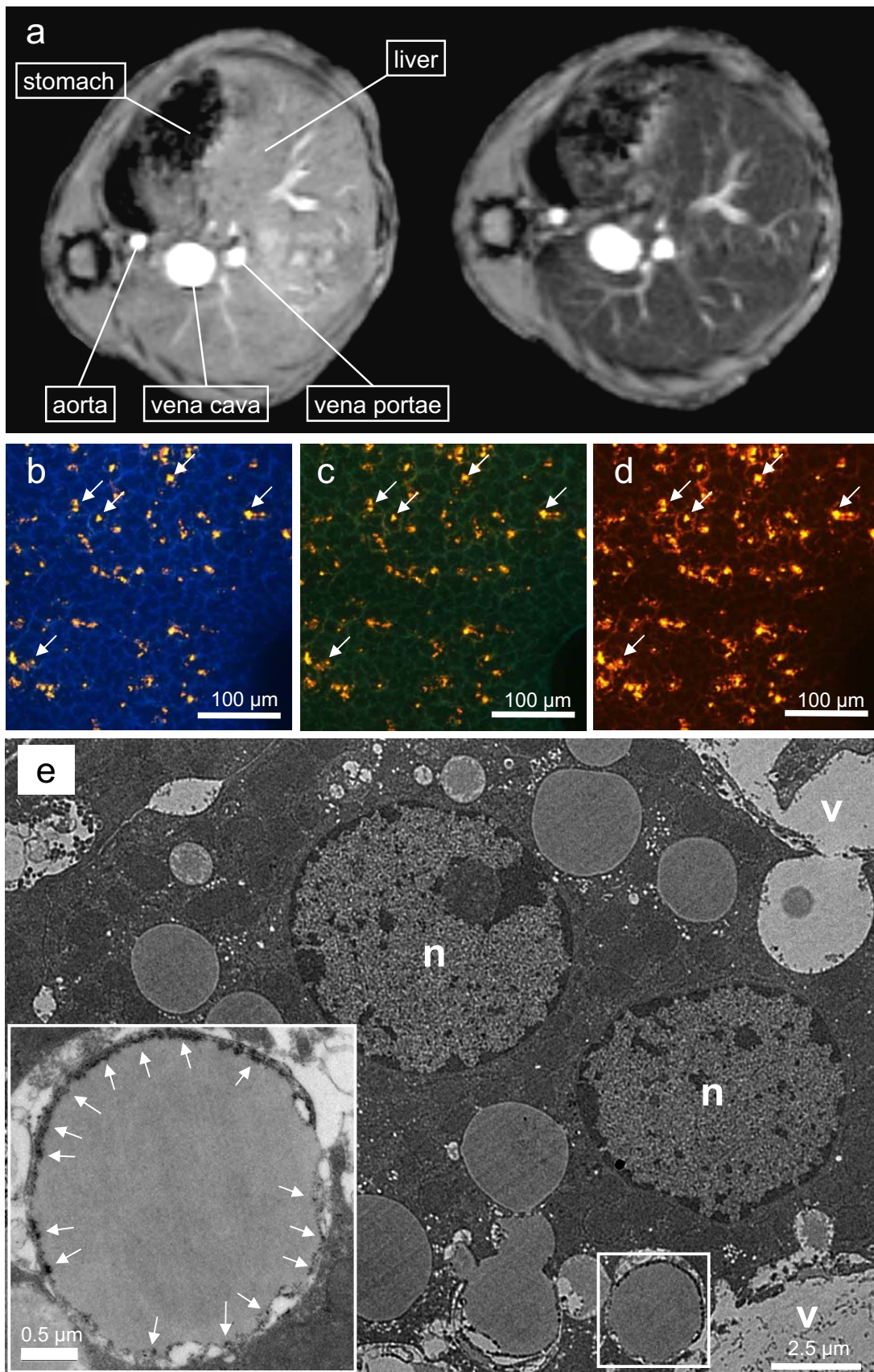
Bruns et al., 2008  
Figure 2



Bruns et al., 2008  
Figure 3

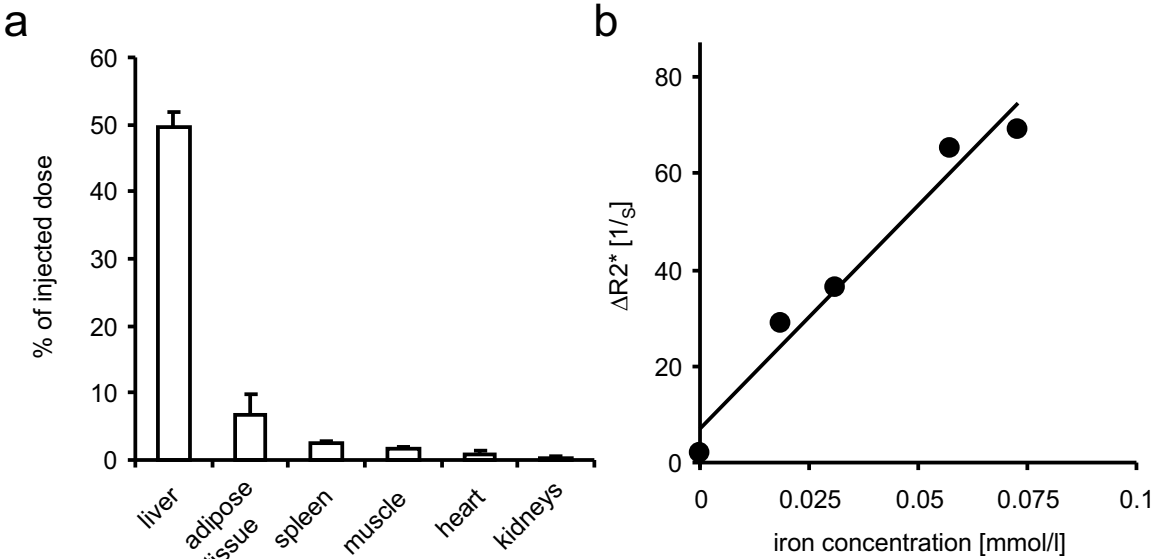


Bruns et al., 2008  
Figure 4

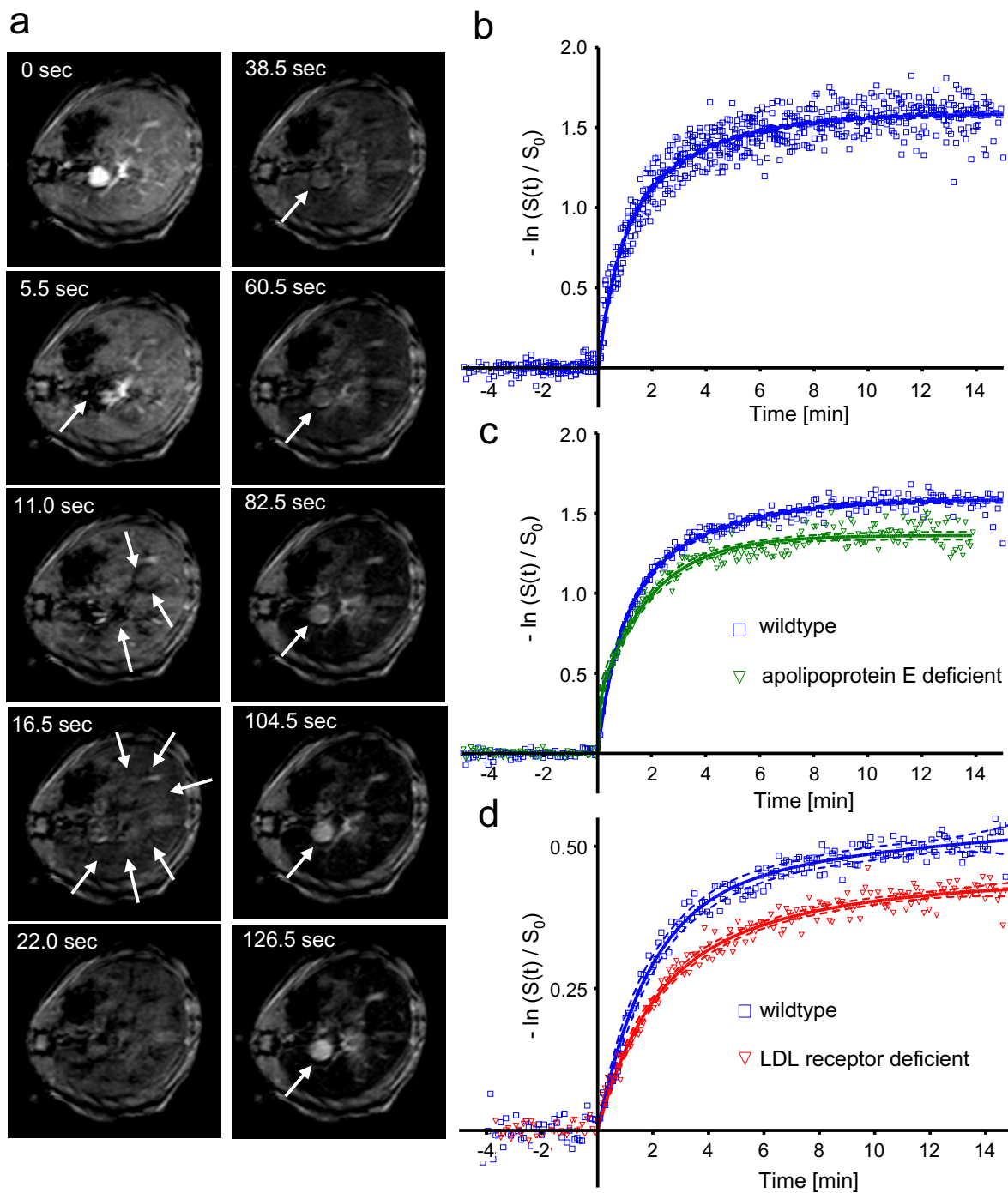


Bruns et al., 2008

Figure 5

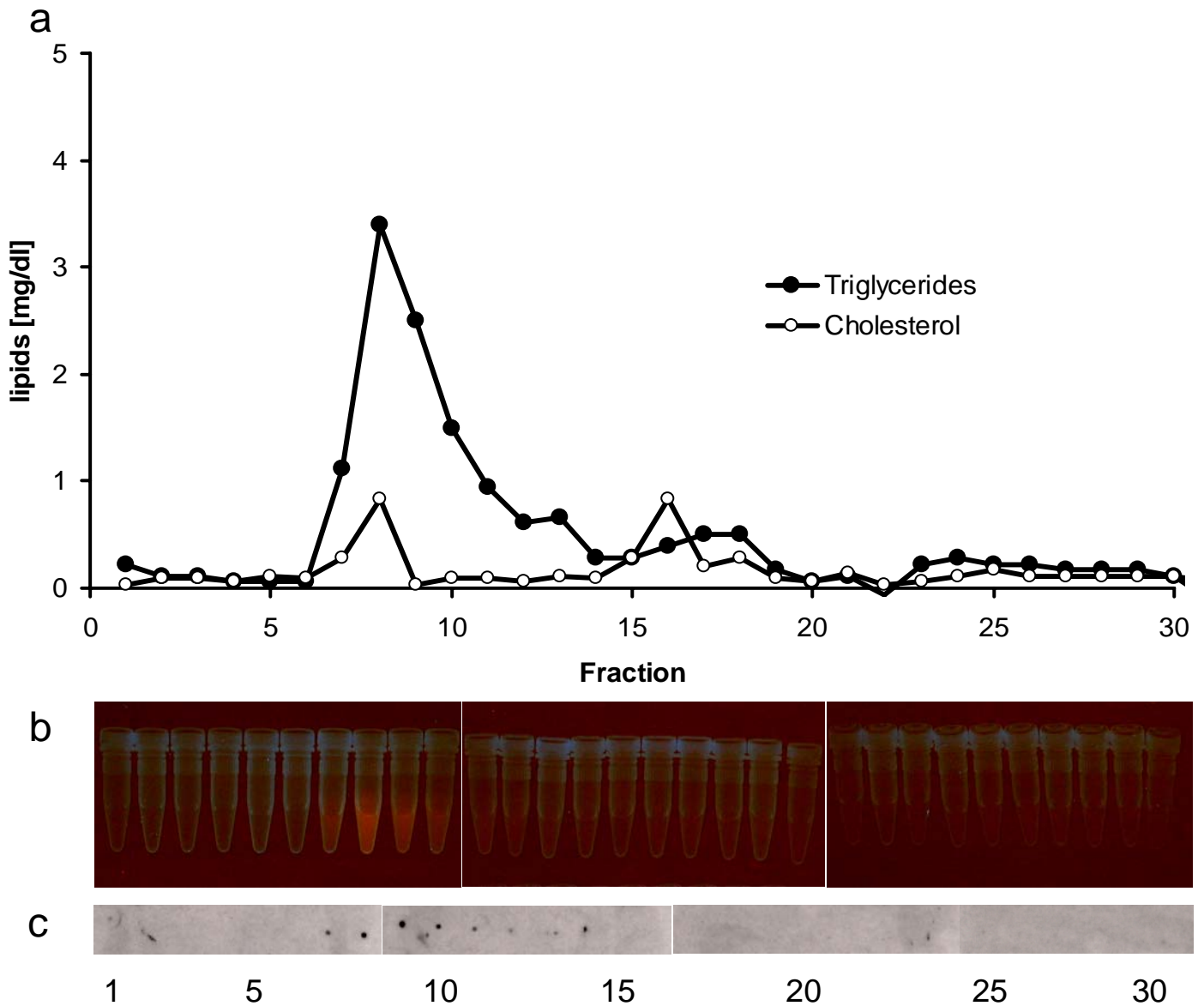


Bruns et al., 2008  
Figure 6



# Supplemental Figure 1

Bruns et. al., 2008



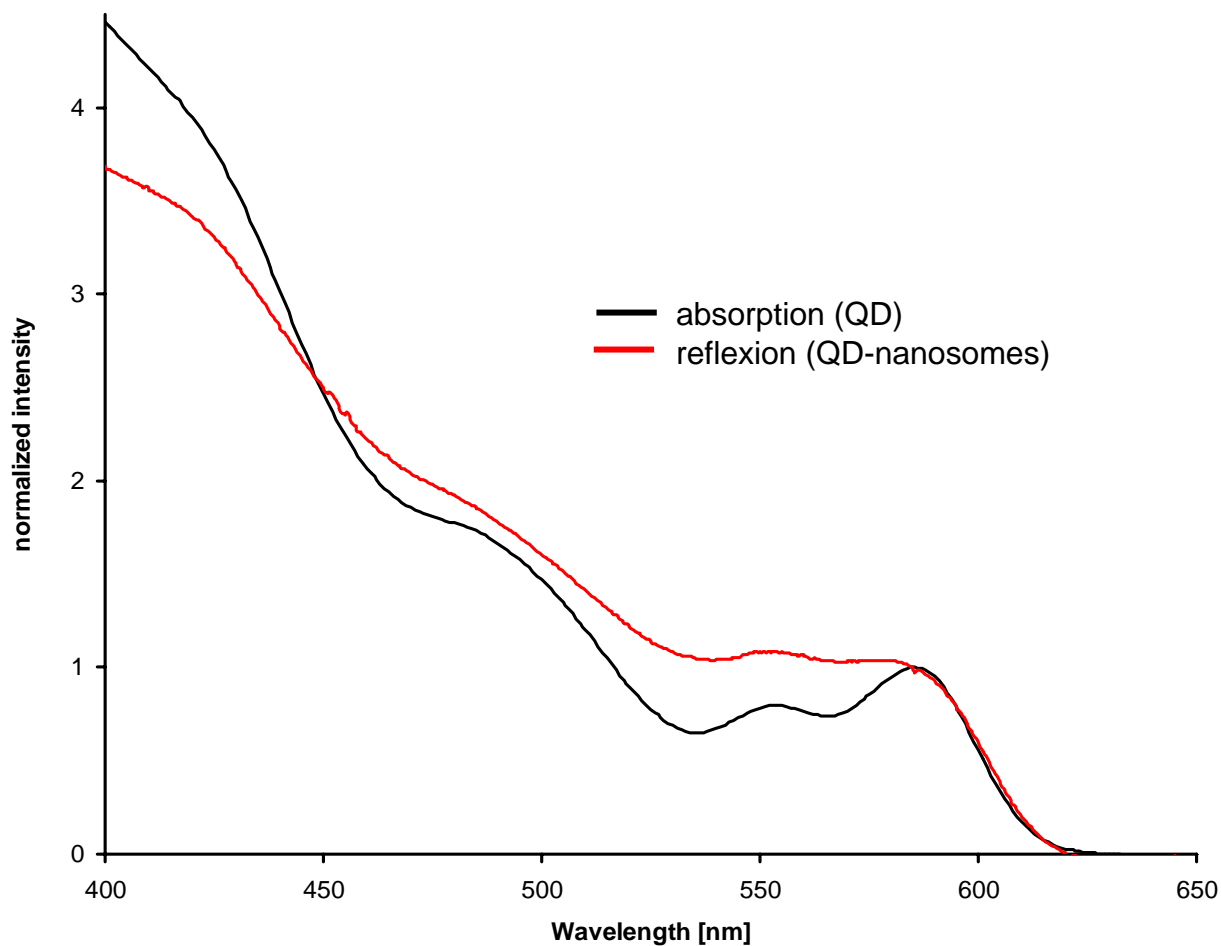
## Functionalization of QD-nanosomes

QD-nanosomes were functionalized with apolipoprotein E and a size exclusion gel chromatography was performed to analyze the association of apolipoprotein E with QD-nanosomes. Cholesterol and triglyceride concentrations in each fraction were analyzed by enzymatic lipid determination (a). Red emission of QD was detected in collection tubes mainly from fraction 7 to 10 (b). Dotblot analysis of the fractions detected apolipoprotein E predominantly in fraction 7 to 10 (c) indicating that apolipoprotein E remained associated with QD-nanosomes and can be used for functionalization.



## Supplemental Figure 2

Bruns et. al., 2008

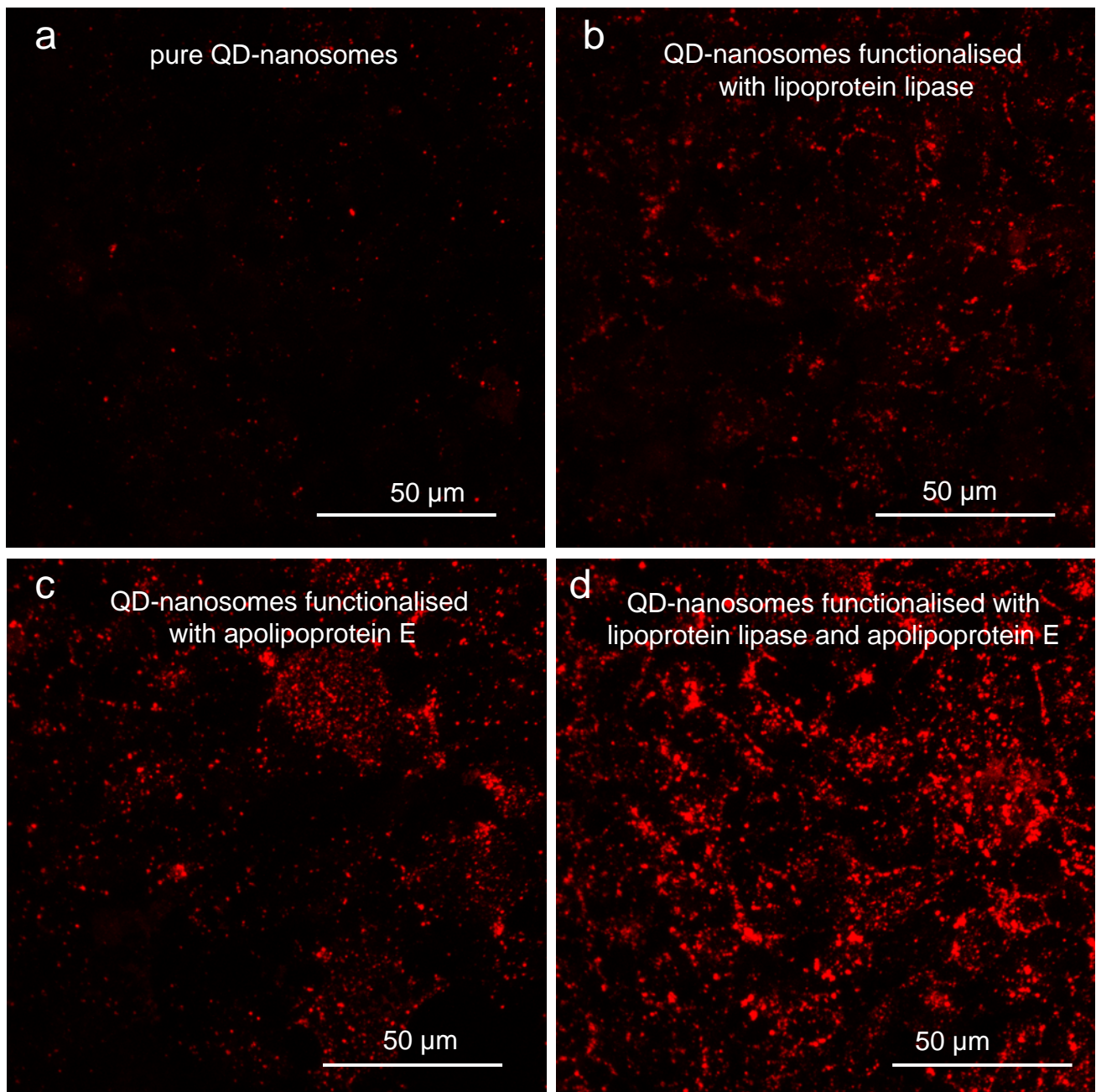


### Reflexion spectrum of QD-nanosomes and absorption spectrum of QD

Reflexion spectrum of QD-nanosomes and the absorption spectrum of the same QD dispersed in chloroform are shown. The characteristic signature is retained in the reflexion spectrum.

## Supplemental Figure 3

Bruns et. al., 2008



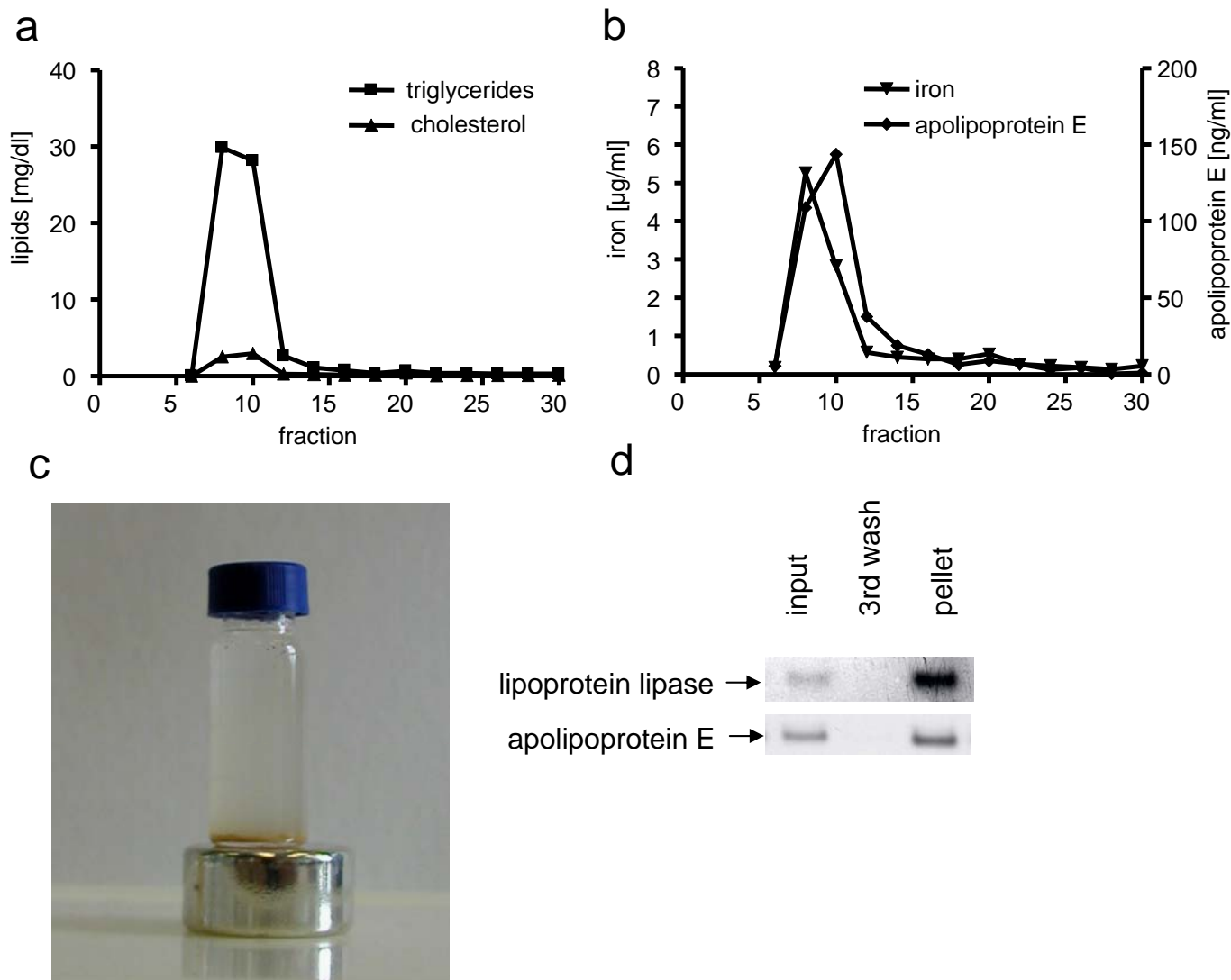
### **Uptake of QD-nanosomes into human liver cells**

Human liver cells (HuH7) were incubated for 60 min at 37°C with (a) pure QD-nanosomes; (b) QD-nanosomes associated prior to the incubation with lipoprotein lipase (1 µg/mg triglycerides), (c) with apolipoprotein E (10 µg/mg triglycerides) or (d) both lipoprotein lipase and apolipoprotein E (1 and 10 µg/mg triglycerides, respectively). Pictures were obtained by confocal laser scanning microscopy.

This figure shows that QD-nanosomes internalization is facilitated by apolipoprotein E and lipoprotein lipase in human hepatoma cells synergistically.

## Supplemental Figure 4

Bruns et. al., 2008



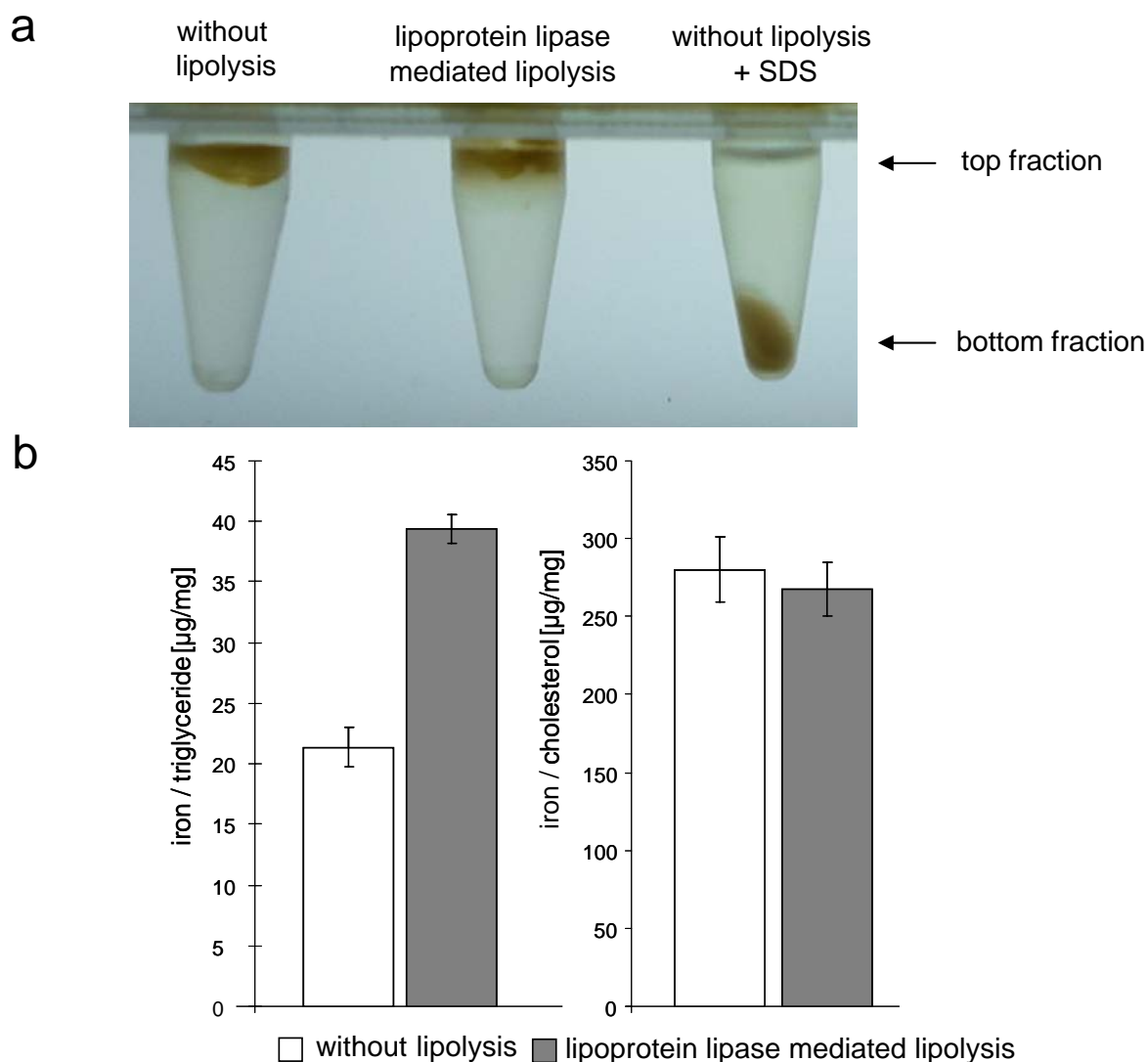
### Functionalization and characterization of SPIO-nanosomes

SPIO-nanosomes were functionalized with apolipoprotein E and size exclusion gel chromatography was performed to analyze the association of apolipoprotein E with SPIO-nanosomes. Cholesterol and triglyceride concentrations in each fraction were analyzed by enzymatic lipid determination (a). Quantitative measurements of apolipoprotein E concentration by ELISA and the iron concentration using bathophenanthroline (b) indicate the stable association of both iron and apolipoprotein E with SPIO-nanosomes.

Similar results were obtained by a magnetic pull down. For this approach, SPIO-nanosomes were functionalized with apolipoprotein E and lipoprotein lipase and a magnetic pull down was performed to analyze the association. SPIO-nanosomes were precipitated using a magnet (c). The supernatant was collected and the SPIO-nanosome pellet was re-suspended and washed in a Tris-buffer solution. The pull down was repeated three times. Western blot analysis revealed an enrichment of apolipoprotein E as well as lipoprotein lipase in precipitated SPIO-nanosomes (d). These data indicate that both apolipoprotein E and lipoprotein lipase are stably associated with SPIO-nanosomes.

## Supplemental Figure 5

Bruns et. al., 2008



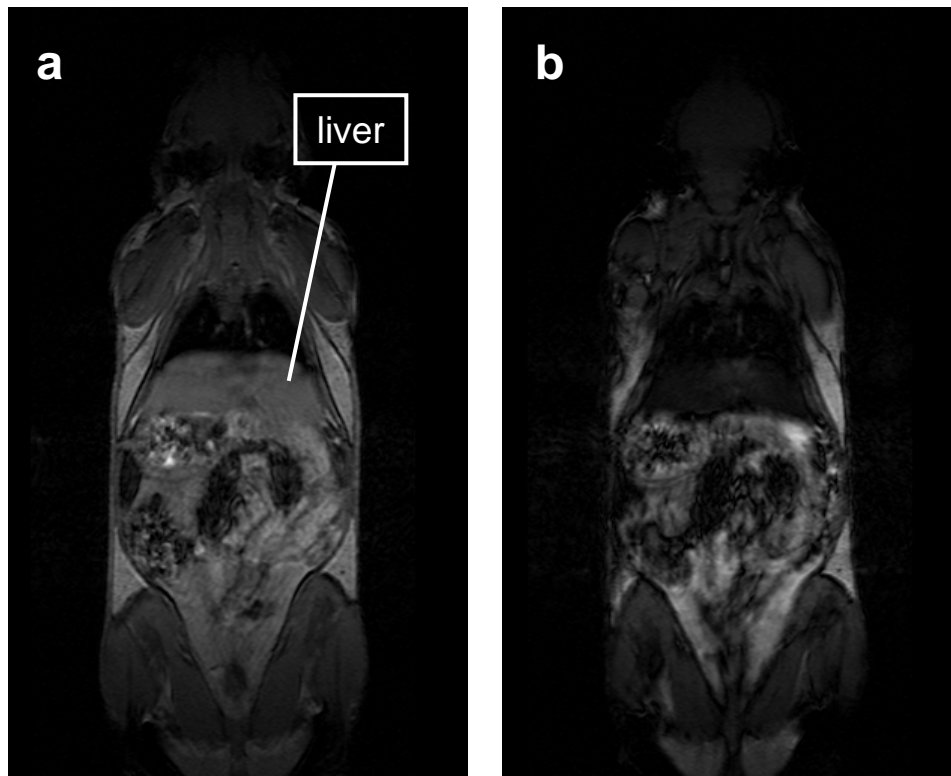
### **SPIO are not released during lipoprotein lipase mediated lipolysis of SPIO-nanosomes**

To analyze whether lipoprotein lipase -mediated lipolysis leads to the release of SPIO from nanosomes, SPIO-nanosomes were incubated without and with lipoprotein lipase for 60 min at 37°C as described in supplemental methods. Then, SPIO-nanosomes were subjected to centrifugation at 13000 rpm for 10 min to separate potentially released SPIO and fatty acids (bottom fraction) from intact nanosomes (top fraction). As demonstrated in figure (a), SPIO appeared in the top fraction independent of lipolysis. As a control, the addition of SDS destroying the micellar structure led to the release of SPIO which precipitated after centrifugation. The iron concentration was virtually identical in the top fraction of SPIO-nanosomes without (59.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and with lipolysis (61.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), whereas iron could not be detected in the top fraction after the addition of SDS.

Lipoprotein lipase-mediated lipolysis leads to the release of free fatty acids and therefore the amount of triglycerides decreased in lipoprotein lipase-processed SPIO-nanosomes. Consequently, we observed an about 2-fold increase in the iron to triglyceride ratio whereas the iron to cholesterol ratio remained constant in the top fraction of re-isolated SPIO nanosomes (b). These data indicate that SPIO can serve as a marker for the core of lipoproteins independent of physiological processing by lipases.

## Supplemental Figure 6

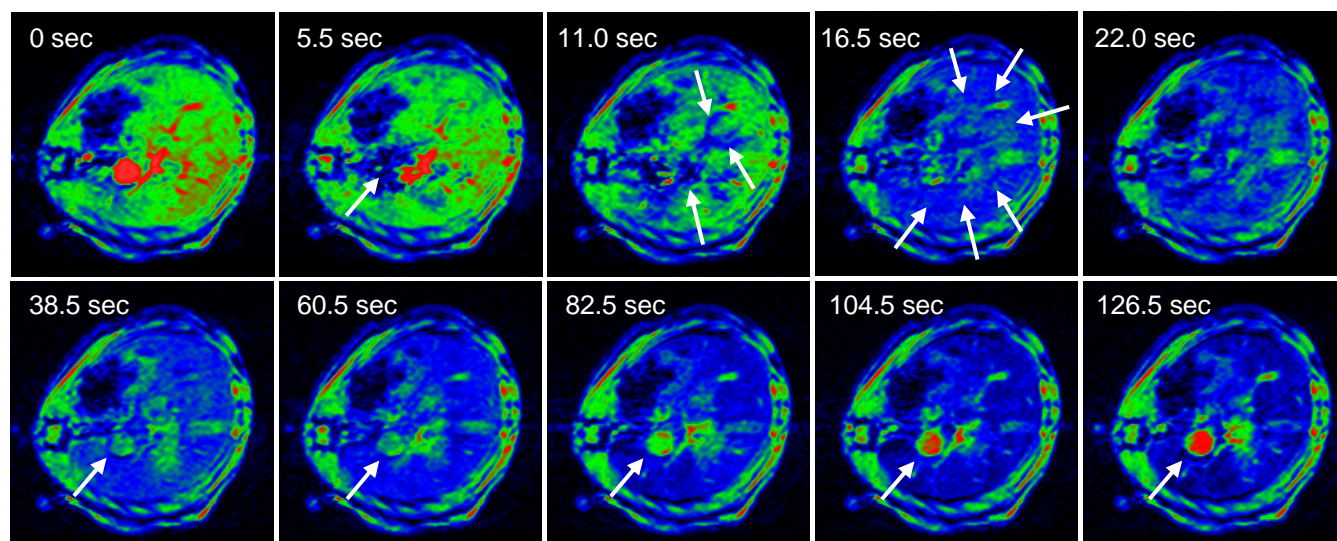
Bruns et. al., 2008



**MRI of the mouse body before and after injection of SPIO-nanosomes**  
Coronar  $T_2^*$ -weighted images of a mouse before (a) and after (b) injection of SPIO-nanosomes are shown. Due to the strong negative contrast of SPIO the liver appears black after the injection while intensities of other organs such as skeletal muscle and adipose tissue are unchanged.

## Supplemental Figure 7

Bruns et. al., 2008



### Real time *in vivo* imaging of hepatic lipoprotein uptake in wild-type mice

An anesthetized FVB wild-type mouse was catheterized and every 5.5 seconds a  $T_2^*$ -weighted image was obtained (detailed parameters are given in supplemental table 1). For at least 3 min the native signal intensity was recorded before 200  $\mu$ l of a SPIO-nanosomes solution with 5 mg/ml triglycerides were tail vein injected (0 sec). SPIO-nanosomes diminished the blood signal (see arrow at 5.5 sec pointing to the vena cava and arrows at 11 sec pointing to hepatic vessels). Then, SPIO-nanosomes are cleared from the blood (arrow at 38.5 sec) and simultaneously the liver becomes less intense (arrows at 16.5 sec) indicating hepatic particle clearance. To improve visual impression, grayscale images were converted to color images via gradient look-up-table (LUT; blue represent low, green intermediate and red high signal intensity, respectively).

# Supplementary Methods

## Synthesis and characterization of nanocrystals

### 1. CdSe/CdS nanocrystals

Semiconductor CdSe/CdS nanocrystals were synthesized using the “greener” approach developed by Mekis et al.<sup>1</sup>. In the first step, CdSe core nanocrystals were prepared. For this purpose, selenium and cadmium stock solutions were prepared and stored in a glove box. Selenium stock solution was prepared by dissolving 1.58 g of selenium (99.999%, ChemPur) in 20 ml of distilled tri-*n*-octylphosphine (TOP, 90%, Fluka) and the stock solution of cadmium-acetate was prepared by dissolving 0.80 g of cadmium-acetate (99.99 %, ChemPur) in 20 ml of TOP. In a typical procedure, 8 g of tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO, > 98%, Merck) were dried and degassed under vacuum at 180°C for 1 h in a 50 ml three-necked flask. Then, TOPO was cooled to 100°C, 5 g of hexadecylamine (HDA, > 92%, Merck) and 0.15 g of *n*-tetradecylphosphonic acid (TDPA, 99% Alfa Aesar) were added. The drying procedure was continued at 120°C under vacuum for 20 min. Selenium stock solution (2 ml) was added and the reaction mixture was heated to 300°C. After reaching the nucleation temperature, 3 ml of the cadmium ion stock solution were injected under vigorous stirring. After the nucleation step, the reaction temperature was lowered to the growth temperature of 260°C. Depending on the size of the nanocrystals required, the reaction time was varied.

A CdS shell was grown around CdSe by injection of H<sub>2</sub>S gas. The reaction mixture containing the freshly prepared CdSe nanocrystals was set to 140°C. After the nitrogen flow was stopped, H<sub>2</sub>S gas was injected in 2 ml portions (1 injection every 15 min) through a septum into the stirred solution. Typically, a total amount of 8 ml was injected. After the H<sub>2</sub>S addition, the reaction mixture was stirred for further 30 min. Then the nitrogen flow was recommenced, the temperature decreased to 100°C and the solution was stirred for one more hour. After cooling to 50°C, 15 ml of chloroform were added to the solution. The obtained nanocrystals were precipitated using methanol and re-dissolved in chloroform. The chloroform solution of nanocrystals was filtered through a PTFE 0.2-μm membrane filter. After filtration, the precipitation procedure was repeated twice. For further use, the nanoparticle stock solution was filtered and stored at room temperature. QD and SPIO were characterized by electron microscopy, optical spectroscopy and magnetometry.

### 2. CdSe/CdS/ZnS nanocrystals

As for the CdSe/CdS nanocrystals, the synthesis of CdSe/CdS/ZnS nanocrystals was performed by the injection of H<sub>2</sub>S gas<sup>2</sup>. In a typical procedure, a mixture of 0.3 g of zinc-

acetate (99.99 % Aldrich) and 3 g HDA were dried and degassed at 130°C under vacuum for 1 h and then added into a solution of freshly prepared CdSe/CdS nanocrystals at 90°C. The mixture was heated to 220°C, the nitrogen flow was stopped and a total of 8-10 ml of H<sub>2</sub>S gas were injected in 2 ml portions (1 injection every 15 min) through a septum. After the H<sub>2</sub>S addition, the reaction mixture was cooled to 90°C and stirred one more hour under a nitrogen flow. Then the solution was cooled to 50°C and 15 ml of chloroform were added. The purification procedure was the same as in the case of the CdSe/CdS nanocrystals.

### **3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals**

Magnetite nanocrystals have been synthesized according to a reported procedure<sup>3</sup>. Briefly, 2 mmol iron(III)acetylacetonate (Strem, 99 %), 10 mmol 1,2-hexadecanediol (Aldrich, 90 %), 6 mmol oleic acid (Aldrich, 90 %), 6 mmol oleylamine, (Aldrich, 70 %), and 20 ml benzyl ether (Aldrich, 99 %) were mixed and heated to 200°C for 2 h under nitrogen atmosphere. Finally, the mixture was heated to 300°C under nitrogen for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and the nanocrystals were separated from the solvent through the addition of 40 ml ethanol followed by centrifugation (10 min, 3260g). Afterwards, nanocrystals were re-dispersed in 5 ml of hexane. This purification step was repeated once. To remove large aggregates the nanocrystals were filtered through a 0.2 µm PTFE syringe filter.

Transmission electron microscopy images for all three described nanocrystals were obtained using a Philips CM-300 microscope (300 kV) and dynamic light scattering was carried out using a Malvern Zeta Sizer Nano-ZS as described<sup>4</sup>.

## **Characterization of SPIO nanosomes**

### **1. Determination of iron concentration**

The concentration of iron was determined using a commercial graphite tube Atomic Absorption Spectrometer (Perkin-Elmer 4100) after particle disintegration using a mixture of 65% nitric acid and 30% hydrogen peroxide (5:1, v/v). Alternatively, the iron concentration was determined based on a photometric assay using the iron specific organic dye bathophenanthroline after dissociation of SPIO-nanosomes with hydrochloric acid.

### **2. *In vitro* hydrolysis of SPIO-nanosomes**

For *in vitro* lipolysis, SPIO-nanosomes (5 mg triglycerides/ml) were incubated without or with 4 µg/ml bovine lipoprotein lipase in the presence of 100 µg/ml HDL and 0.5% BSA for 60 min at 37°C. For a control, a final concentration of 2% SDS was added to destroy micellar



structure. After hydrolysis, nanosome solutions were brought to a final concentration of 1.1 g/ml KBr and re-isolated by centrifugation at 18,000 rcf for 10 min. The top and bottom fractions were collected and analyzed for triglycerides and cholesterol using commercial kits as well as for iron levels using bathophenanthroline.

### ***In vitro* QD- and SPIO-nanosomes uptake**

For *in vitro* uptake experiments nanosomes were functionalized with apolipoprotein E and lipoprotein lipase. Recombinant apolipoprotein E (PanVera, 10 µg apolipoprotein E per mg lipids) and purified lipoprotein lipase (1 µg lipoprotein lipase per mg lipids) were associated with QD-labeled nanosomes. Association of apolipoprotein E and lipoprotein lipase with QD- and SPIO-nanosomes was confirmed after the re-isolation of particles by gel exclusion chromatography or magnetic pull-down, respectively. Apolipoprotein E and lipoprotein lipase were detected by Western blot analysis using specific antibodies as described<sup>5</sup>. Alternatively radiolabeled SPIO-nanosomes were used instead of QD-labeled nanosomes to quantify the cellular uptake. Human hepatoma cells (HuH7) or primary murine hepatocytes, which were isolated from wild type mice, were used for the experiments as indicated. Cells were washed three times with DMEM prior to the experiments. Then, apolipoprotein E -/ lipoprotein lipase -functionalized nanosomes, apolipoprotein E -functionalized nanosomes, lipoprotein lipase -functionalized nanosomes or nanosomes without functionalization were added to the cells and incubated for 60 min at 37°C. For confocal microscopy surface bound nanosomes were removed by washing two times with ice-cold PBS-Heparin and the cells were fixed in -20°C methanol for five minutes. Cells were washed and kept in PBS (primary hepatocytes) or mounted on a microscope slide (HuH7). Images were obtained using confocal laser scanning microscopy (LSM 510 Meta, Zeiss).

To quantify the uptake, <sup>3</sup>H-cholesterol-oleyl ether radiolabeled SPIO-nanosomes functionalized with apolipoprotein E and lipoprotein lipase, apolipoprotein E alone, lipoprotein lipase alone or without functionalization were added to the cell and incubated for 60 min at 37°C. Surface bound nanosomes were removed by washing one time with ice-cold PBS-Heparin and two times with PBS. Then, the cells were lysated with 0.1 M NaOH, radioactivity of the lysate was determined by liquid scintillation counting and the protein concentration was measured by a standard Lowry assay.

For inhibition experiments <sup>3</sup>H-cholesterol-oleyl ether radiolabeled SPIO-nanosomes functionalized with apolipoprotein E were incubated for 60 min at 37°C and micelles without SPIO but functionalized with apolipoprotein E were added together with the SPIO-nanosomes

but in a 100 times, 50 times, 25 times or 10 times higher concentration. The cells were washed one time with PBS-Heparin (100 U/ml) and two times with PBS. Then, the cells were lysated with 0.1 M NaOH and radioactivity of the lysate was determined by liquid scintillation counting and the protein concentration was measured.

### **Relaxivity measurements**

The contrast in an MR image reflects different processes weighted by their relaxation times  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_2^*$ . The relaxation times and their reciprocals the relaxation rates  $R_1$ ,  $R_2$  and  $R_2^*$  were determined independently.  $T_2$  was measured by multiecho turbo spin-echo sequences, and  $T_2^*$  by multiecho gradient-echo sequences.  $T_1$  measurement followed the LookLocker approach using a gradient echo sequence with an inversion pulse and a series of small flip angle pulses. The sequence parameters are displayed in Supplementary information table 1. The relaxation times were numerical estimated by fitting of the MRI data to a theoretical curve with experimental software (Philips Research Laboratories Hamburg).

The effectiveness of a MRI contrast agent to induce a signal change due to the change of relaxation rates is described by its relaxivities  $r_1$ ,  $r_2$  and  $r_2^*$  at a given magnetic field strength and at a constant temperature. All samples were measured *in vitro* at 3 Tesla (T) in a clinical MR scanner (3T Intera, Philips Medical Systems) in a water bath at 37 °C. The physical value of the relaxivity of SPIO is related to its corresponding change of relaxation rate due to a concentration change of 1 mM Fe. For a more precise determination a dilution series of each sample was prepared and its relaxation rates were measured. The corresponding relaxivities  $r_1$ ,  $r_2$  and  $r_2^*$  are the gradients of the relaxation rates to iron concentration curves and were determined by linear regression.

### ***In vivo* relaxometry**

To determine the  $r_2^*$  relaxivity in the liver *in vivo* (the slope for the change of relaxation rate after SPIO-nanosomes injection related to liver-associated SPIO concentration), anaesthetized and catheterized wild type FVB mice, which were day-time fasted for five hours, were placed in a custom-made small animal solenoid coil for MR imaging. 200  $\mu$ l of different dilutions of SPIO nanosomes (corresponding to 0, 15, 26, 42 and 63  $\mu$ g/ml iron as determined with bathophenanthroline) were injected and the  $T_2^*$  relaxation rate was recorded in the identical section before and 20 minutes after injection of the nanosomes solution (see supplemental table 1 for detailed sequence parameters). Subsequently the anaesthetized mice were sacrificed and the liver weight was measured. The iron concentration in the liver tissue was

calculated based on the SPIO-nanosomes uptake measured with radiolabeled nanosomes (49.56%), the injected volume (0.2 ml), the liver volume based on the liver weight (1.406 g, 1.308 g, 1.368 g, 1.194 g and 1.39 g, respectively; 1 g = 1 ml) and the molar weight of iron (55.845 g/mol) according to this equation:

$$c_{\text{calculated}} = (c_{\text{iron}} * 49.56\% * 0.2\text{ml}) / \left( V_{\text{liver}} * 55.845 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)$$

$c_{\text{calculated}}$  : calculated iron concentration in the liver (mmol/l)

$c_{\text{iron}}$  : iron concentration of the injected SPIO-nanosomes dilution (µg/ml)

$V_{\text{liver}}$  : liver volume calculated based on the liver weight (ml)

The difference in the  $T_2^*$  relaxation rate ( $\Delta R_2^*$ ) before and after injection of SPIO-nanosomes was set into relation to the calculated iron concentration in the liver. The physical value of the relaxivity of SPIO is related to its corresponding relaxation rate change due to a concentration change of 1 mM Fe. The corresponding  $r_2^*$  relaxivity is the gradient of the relaxation rates to iron concentration curves and were determined with PRISM by linear regression.

## Reference List

1. Mekis,I., Talapin,D.V., Kornowski,A., Haase,M. & Weller,H. One-pot synthesis of highly luminescent CdSe/CdS core-shell nanocrystals via organometallic and "greener" chemical approaches. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 7454-7462 (2003).
2. Talapin,D.V. *et al.* CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 18826-18831 (2004).
3. Sun,S.H. *et al.* Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 273-279 (2004).
4. Tromsdorf,U.I. *et al.* Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano Letters* **7**, 2422-2427 (2007).
5. Heeren,J., Niemeier,A., Merkel,M. & Beisiegel,U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **80**, 576-584 (2002).

# Supplemental Table 1

Bruns et. al., 2008

	FOV / [mm]	thick-ness / [mm]	matrix	FA / [°]	TR / [ms]	TE / [ms]	echoes	echo spacing / [ms]	phases	NSA	delay / [ms]
<b><i>In vitro</i></b>											
T <sub>1</sub> relaxometry	200	5	208	6	9.4	4.6	1	N/A	60	1	5000
T <sub>2</sub> relaxometry	200	5	208	90	771	4.6	30	4.6	N/A	1	N/A
T <sub>2</sub> <sup>*</sup> relaxometry	200	5	224	30	500	3.0	111	1.5	N/A	3	N/A
<b><i>In vivo</i></b>											
T <sub>2</sub> <sup>*</sup> relaxometry	50	2	128	40	65	3.8	15	3.1	N/A	3	N/A
T <sub>2</sub> <sup>*</sup> w dynamic sequence	40	2	144	20	20	6.9	1	N/A	N/A	3	N/A

## Detailed parameters of the MRI-sequences applied in the experiments

Abbreviations: Field of View (FOV), Repetition Time (TR), Echo Time (TE), number of signal averages (NSA), excitation flip angle (FA). **The measurements were done in the imaging-mode at 37°C.**

## ***Nanosomes: A new tool to non-invasively study postprandial lipoprotein metabolism in vivo***

Oliver T. Bruns, Ulrike Beisiegel and Joerg Heeren  
(on behalf of all co-authors from Bruns et al, 2009)

### **Bruns et al. reply:**

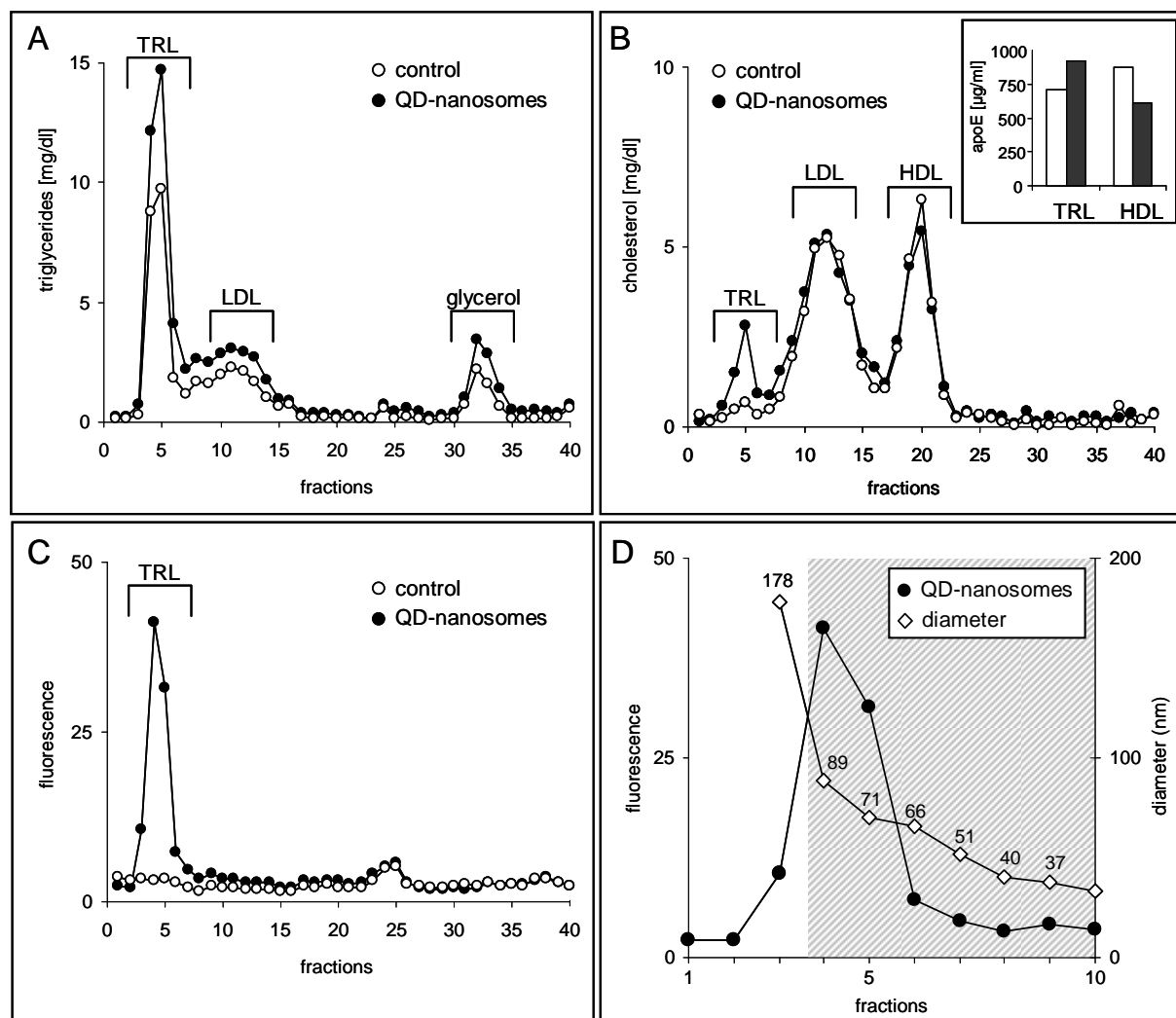
In the past two decades it has been shown by several research groups (for review see 1) that recombinant triglyceride-rich emulsions with a natural lipid composition closely mimic the behaviour of native lipoproteins in the postprandial phase (this is the period after eating a meal). As mentioned in the original manuscript (2) the aim of the study was to create a model for imaging and non-invasive quantification of postprandial lipoprotein metabolism in real time using either QD or SPIO embedded within the core of triglyceride-rich emulsions (designated QD- or SPIO-nanosomes, respectively). To obtain a natural lipid composition leading to a size similar to postprandial lipoproteins we used a physiological lipid mixture isolated from natural human chylomicrons. Chylomicrons are synthesized in the postprandial phase by enterocytes within the intestine and have a diameter between 75 – 1200 nm depending on the composition of the meal (3). The sizes of QD- or SPIO-nanosomes are approximately 250 nm and therefore are within the size of physiological postprandial lipoproteins.

After assembling within intestinal cells, chylomicrons enter the blood stream via the thoracic duct which is the largest lymphatic vessel in the body draining into the systemic circulation via the left subclavian vein into the heart. Similar to chylomicrons, intravenously injected nanosomes reach the systemic circulation via the heart. In addition, it is important to note that nascent chylomicrons do not contain any apolipoprotein E (apoE) or lipoprotein lipase (LPL) (3). Consequently, nanosomes do not need to contain exogenously added apoE and LPL when serving as a model particle for chylomicrons.

After entering the systemic circulation, postprandial lipoproteins are immediately converted by the hydrolytic activity of the enzyme LPL, which is bound to cell surface proteoglycans located at the luminal site of endothelial cells in adipose tissue and muscles. During hydrolysis fatty acids are released and internalized into the underlying cells whereby large chylomicrons are converted to smaller remnant particles with a size smaller than 100 nm (3). Lipoprotein lipase remains associated with these remnants which simultaneously become enriched with HDL-derived apoE (4-6). These particles are now small enough and can pass

the fenestrated endothelium of liver sinusoids allowing the internalization. The uptake process is mediated by the interaction of apoE and LPL with lipoprotein receptors of parenchymal liver cells.

Although similar processing has been shown for triglyceride-rich emulsions in animals and in humans *in vivo* (1,7,8) as well as for SPIO-nanosomes *in vitro* before (2), we performed additional experiments to address the concerns with regard to the size and physiological processing formulated by Mulder et al (figure 1).



**Figure 1. Processing of QD-nanosomes *in vivo***

Lipoprotein profiles from plasma isolated before (control) and 1 min after the injection of QD-nanosomes into LDL receptor deficient mice were generated by FPLC analysis. (A) Triglycerides, (B) cholesterol, (C) fluorescence intensities and (D) particle sizes determined by dynamic light scattering were analyzed in each fraction. QD-nanosomes were detectable within the size of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) but not in the LDL and HDL fractions. Increased glycerol levels as well as the transfer of apoE from HDL to TRL (see inset in B; apoE levels were determined in pooled TRL and HDL fractions) indicate LPL-mediated hydrolysis and apoE enrichment of QD-nanosomes. Fluorescence detection and size determination within the same fractions revealed that QD-nanosomes are rapidly hydrolyzed to particles smaller than 100 nm *in vivo* (indicated by the striped area).

Figure 1 shows that after the injection of QD-nanosomes, these particles are hydrolyzed which leads to a size smaller than 100 nm and that the particle become enriched with apoE

during hydrolysis, indicating that the nanosomes undergo physiological processing within the circulation. Consequently and as expected from former experiments with recombinant triglyceride-rich emulsions, no differences in the pharmacokinetics and organ distribution were detected when comparing the clearance of radiolabeled SPIO-nanosomes with chylomicrons (data not shown). In another set of experiments the concomitant injection of fluorescently labelled natural chylomicrons and QD-nanosomes resulted in an identical fluorescent pattern within liver cells underlining the similar processing of natural postprandial lipoproteins and nanosomes (data not shown).

To demonstrate the specificity of the uptake process using non-invasive MR imaging, we have shown the defective clearance of SPIO-nanosomes in knock-out mice lacking a lipoprotein receptor (in this case the LDL receptor) or apoE (2). These are the most common, extensively characterized and well understood mouse models to study lipoprotein receptor mediated endocytosis, which is why we used them in this context. Mulder et al. brought up the concern that the nanosomes may simply be taken up by hepatic macrophages (Kupffer cells) and defective clearance could be explained by the diseased liver in these mouse models (Mulder et al). They envision a scenario in which the liver disease would be an explanation for the reduced nanosome uptake and suggest that nanosome uptake is facilitated by Kupffer cells. ApoE deficient mice are known to have steatosis which is associated with an increased number of Kupffer cells (9). Thus, if anything, apoE deficiency should increase the unspecific uptake of nanosomes by hepatic macrophages, which was definitely not the case in our study (2). To our knowledge an impaired liver function in LDL receptor deficient mice is not described. Thus, this concern cannot be seen as an argument against the animal model that we have chosen. In addition, to our knowledge, there exists no better alternative to study impaired receptor-mediated lipoprotein clearance than these two standard models: LDL receptor- and apoE deficiency. In summary, we have shown and are confident that QD- as well as SPIO-nanosomes are processed like postprandial lipoproteins *in vivo* and therefore can serve as a valuable tool to visualize and model non-invasively the quantification of postprandial lipoprotein clearance

## References

1. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. Rensen PC, de Vrueth RL, Kuiper J, Bijsterbosch MK, Biessen EA, van Berkel TJ. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Apr 25;47(2-3):251-76. Review.
2. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. Bruns OT, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Lauterwasser J, Nikolic MS, Mollwitz B, Merkel M, Bigall NC, Sapra S, Reimer R, Hohenberg H, Weller H, Eychmüller A, Adam G, Beisiegel U, Heeren J. *Nat Nanotechnol.* 2009 Mar;4(3):193-201. Epub 2009 Jan 25.
3. Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. Havel,R.J. and Kane,J.P. In *The metabolic basis of inherited disease.* C.R.Scriver, Beaudet,A.L., 2001. Sly,W.S., Childs,B., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B., editors. McGraw, New York. 2705-2717.
4. Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats. Imaizumi K, Havel RJ, Fainaru M, Vigne JL. *J Lipid Res.* 1978 Nov;19(8):1038-46.
5. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U. *J Mol Med.* 2002 Sep;80(9):576-84.
6. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. Zheng C, Murdoch SJ, Brunzell JD, Sacks FM. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):891-6.
7. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. Redgrave TG, Maranhao RC. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Jun 14;835(1):104-12.
8. Clearance from plasma of triacylglycerol and cholesteryl ester after intravenous injection of chylomicron-like lipid emulsions in rats and man. Redgrave TG, Ly HL, Quintao EC, Ramberg CF, Boston RC. *Biochem J.* 1993 Mar 15;290 ( Pt 3):843-7.
9. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6366-75.



# **Towards the development of a $T_1$ MR contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles**

*Ulrich I. Tromsdorf<sup>†</sup>, Oliver T. Bruns<sup>‡</sup>, Sunhild C. Salmen<sup>†</sup>, Ulrike Beisiegel<sup>‡</sup>, and Horst*

*Weller<sup>†\*</sup>*

<sup>†</sup> Institute of Physical Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

<sup>‡</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II: Molecular Cell Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

\*Corresponding author: E-Mail: [weller@chemie.uni-hamburg.de](mailto:weller@chemie.uni-hamburg.de)

In this study we systematically developed a potential MR  $T_1$  contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles. We adjusted the size of the crystalline core providing suitable relaxometric properties. In addition, a dense and optimized PEG coating provides high stability under physiological conditions together with low cytotoxicity and low non-specific phagocytosis into macrophage cells as a part of the reticulo endothelial system (RES) at biologically relevant concentrations. The as developed contrast agent has the lowest  $r_2/r_1$  ratio (2.4) at 1.41 T reported so far for PEGylated iron oxide nanoparticles as well as a  $r_1$  relaxivity ( $7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) that is two times higher compared to that of Magnevist as a typical  $T_1$  contrast agent based on Gadolinium as a clinical standard. (Moreover, our contrast agent should provide low long-term toxicity compared to Gadolinium based contrast agents which can lead to nephrogenic systemic fibrosis as a possible side effect.)

**Introduction.** Superparamagnetic nanoparticles are of special interest for various applications in biotechnology and biomedicine. Their unique magnetic properties which might be fine tuned on the nanometer scale make them particularly promising in both diagnosis and therapy. Currently, one of the most important and rapidly growing fields is the use of iron oxide particles as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI).<sup>[1-3]</sup>

The main task of contrast agent application in MRI is a shortening of the relaxation times  $T_1$  and  $T_2$  which characterize the two independent processes of proton relaxation.  $T_1$  describes the spin-lattice or longitudinal relaxation whereas  $T_2$  specifies the spin-spin or transverse

relaxation of the excited protons. The efficiency of a contrast agent is usually expressed as its relaxivity  $r_1$  or  $r_2$ , respectively, that is, the ability to shorten the relaxation time per millimole of the contrast agent.

For a first classification, contrast agents can be divided into two major types. Positive contrast agents act to shorten mainly the relaxation time  $T_1$  and at the same time provide moderate impact on  $T_2$ , thus generating a bright image. Negative contrast agents on the other hand mainly shorten the transverse relaxation time  $T_2$  and lead to signal reduction, that is a dark image.

Positive contrast agents commonly consist of paramagnetic chelates such as Gd-DTPA.<sup>[4, 5]</sup> Their relaxivity ratio  $r_2/r_1$  commonly is in the range of 1-2. Recently, MnO nanoparticles have also been used although they exhibited low relaxivities.<sup>[6]</sup> Negative contrast agents predominantly consist of iron oxide particles which can be roughly classified according to their hydrodynamic sizes. They show high  $r_2/r_1$  ratios of at least 10. In this sense one important group are iron oxides with hydrodynamic sizes of 40-100 nm which are applied to image cells of the reticulo endothelial system (RES), i. e. macrophages in the liver or the spleen. Smaller particles of approximately 20 nm size can also be used for MR lymphography. The use of iron oxide particles as negative contrast agent arises from the large hydrodynamic diameter of many clinically applied products or controlled clustering<sup>[7, 8]</sup> of individual particles. Even single particles with smaller hydrodynamic diameter are preferentially suitable for  $T_2$  weighted MRI due to their strong magnetization at common fields used for MRI which is associated with their superparamagnetism.<sup>[9, 10]</sup> Recently, we systematically investigated the impact of surface modification and compartmentalization of superparamagnetic nanoparticles on negative contrast enhancement and developed a  $T_2$  contrast agent that allows direct imaging of metabolic processes.<sup>[11, 12]</sup> Other results confirmed the importance of surface chemistry on proton relaxivity.<sup>[13]</sup>

The use of iron oxide particles in  $T_1$  weighted imaging is in most cases limited due to the large  $r_2/r_1$  ratio although the impact on  $T_1$  is significant and often higher compared to paramagnetic chelates. Therefore, only few examples are published so far where iron oxide particles are applied as  $T_1$  contrast agent.<sup>[14]</sup> An important example are so-called blood pool contrast agents that are applied to image particular vessel structures in MR angiography<sup>[15]</sup> (MRA) and provide longer blood half-life compared to the classes described above. Iron oxide based MRA consist of very small iron oxide particles and are coated with small molecules such as citrate.<sup>[16]</sup> As a main advantage over conventional Gd based  $T_1$  contrast agents, iron oxide particles provide low long term toxicity. Gd-based contrast agents have

been shown recently to be associated with the development of nephrogenic systemic fibrosis in patients with impaired kidney function, a common disease with increasing incidence in the elderly.<sup>[17]</sup> This severe side effect of Gd-based contrast agents might render these patients wheel-chair dependent and led to new recommendations for the application of these contrast agents.

A strategy to form  $T_1$  contrast agents suitable for MRA out of iron oxide should involve the following aspects. The size of the crystal core must be suitable synthesized for  $T_1$  shortening while the impact on  $T_2$  has to be limited. This is in particular the case for ultrasmall iron oxide nanoparticles of core sizes around 5 nm. Second, the organic shell surrounding the core must be designed carefully with respect to stability under physiological conditions as well as a complete prevention of aggregation of individual particles which would result in  $T_2$  contrast enhancement again.<sup>[18-20]</sup> Third, these particles should exhibit a low degree of non-specific uptake by phagocytic cells to display a prolonged circulation time.

This paper presents the development of a  $T_1$  blood pool contrast agent consisting of very small iron oxide nanoparticles that are coated with poly(ethylene glycol) (PEG) based ligands. Core size and length of the PEG chain were optimized according to stability, relaxometric properties, cytotoxicity and unspecified cell uptake. So far, a lot of work has been done on the use of PEG as ligand for iron oxide nanocrystals.<sup>[21-24]</sup> However, the coating of nanoparticles with PEG often results in large hydrodynamic diameters and the formation of at least small amounts of aggregates<sup>[25, 26]</sup> which in turn enables these systems to act as  $T_2$  contrast agent.

We synthesized monodisperse (less than 10 % standard deviation) iron oxide nanoparticles with core sizes of 4 and 6 nm, respectively and therefore optimized the relaxometric properties. We then used phosphate functionalized PEG for phase transfer to aqueous solution and adjusted the PEG chain length in order to completely prevent aggregation of particles under physiological conditions and to minimize cytotoxicity and unspecific cell uptake into macrophages. Therefore, we were able to synthesize an iron oxide based  $T_1$  contrast agent with a robust PEG coating providing the smallest  $r_2/r_1$  ratio of 2.4 at clinical relevant fields (1.41 T) reported so far for PEG coated superparamagnetic nanoparticles. The  $r_1$  relaxivity of  $7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  is approximately two times higher than conventional Magnevist (Gd-DTPA). However, our contrast agent should provide low long-term toxicity.

**Results and Discussion.** Oleic acid stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (4 and 6 nm mean core diameter) were synthesized as reported previously.<sup>[27-29]</sup> The particles show a narrow size distribution (standard deviation <10 %) as confirmed by TEM and the

expected fcc spinel structure as well as a typical superparamagnetic behavior which was demonstrated by magnetization measurements.

For phase transfer into aqueous medium we used poly(ethylene glycol) (PEG) based ligands which we employed to ligand exchange reactions. To provide robust linkage of the polymers we synthesized the polymers with anchor groups which are known to form strong binding to the surface of iron oxide nanoparticles. For this purpose, phosphates have previously been demonstrated to provide strong binding to the surface of iron oxide nanoparticles.<sup>[30, 31]</sup> The PEG based ligands with various PEG chain lengths were synthesized according to scheme 1. To introduce a phosphate group we simply used poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG) in a reaction with an excess  $\text{POCl}_3$  and subsequent hydrolysis of the remaining two P-Cl groups. We confirmed via  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy that the monoester was formed. However, for the short PEG chain (350 g/mol) we observed a second peak of very low intensity in the  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum which probably appears due to a small amount of biester product.

For the ligand exchange reaction we directly transferred the particles from tetrahydrofuran into aqueous environment after heating to 60 °C with a large excess of polymer. This approach allowed quantitative conversion of the hydrophobic nanocrystals to hydrophilic ones. Furthermore, we found that a minimal length of a PEG chain of ~500 g/mol that is attached to the anchor group is required to circumvent aggregation processes.

To characterize the ligand exchanged nanoparticles we used TEM, Dynamic Light Scattering (DLS) and Gel Filtration Chromatography (GFC). Using phosphate-PEG we were able to synthesize particles with hydrodynamic diameters of ~10 nm in water and slightly below as can be seen from fig.1d. This seems reasonable for a core size of 4 nm, calculating the hydrodynamic diameter of a PEG 2000 molecule to be 2.8 nm in solution.<sup>[32]</sup> In fig. 1 representative TEM images of 4 nm sized iron oxide nanoparticles coated with oleic acid (a), PEG 550 (b), and PEG2000 (c) are depicted. As one can observe the particles are evenly distributed after water is evaporated from the TEM grid with an increasing distance between the particles with increasing polymer chain length. This fact together with the DLS results (fig. 1d) demonstrates that the particles are homogeneously dispersed in contrast to previous results where aggregates or worm-like structures were obtained. This may be attributed to the strong bond of the phosphate group to the particle surface as well as the complete absence of any hydrophobic part within the ligand structure.

All particle dispersions show high stability under various pH treatments, and under ionic strength up to 2 M of NaCl and various buffer systems without any change in hydrodynamic

diameter and therefore without any aggregation as confirmed by DLS measurements in good agreement with other results.<sup>[33]</sup>

We furthermore investigated the stability of the as prepared nanoparticles under physiological conditions using GFC as this method is very sensitive to small changes in the hydrodynamic diameter. This is particular important for a  $T_1$  blood pool contrast agent because an aggregation would provide a strong impact on  $T_2$ . Therefore, the nanoparticles were incubated in fetal calf serum (FCS) for 2 h at 37 °C and the obtained GFC curve was compared to a corresponding sample that was incubated in a Tris/NaCl-buffer under the same conditions (fig. 2a). The results most likely demonstrate the adsorption of plasma proteins to the particle surface and, as a consequence, a slight increase in hydrodynamic diameter. We tested PEG based ligands with other anchor groups such as carboxylic acid but obtained similar results. This behavior is in contrast to other systems like CdSe/ZnS where the adsorption could be completely prevented.<sup>[34]</sup> However, we observed significant differences with respect to the polymer chain length that is attached to the phosphate anchor group (fig. 2b). For the smallest polymer chain ( $M=350$  g/mol) we found the strongest increase in hydrodynamic diameter due to an insufficient stabilization of nanoparticles in solution. Here we found a substantial part of particles in the early GFC fractions (F5-6). The use of polymers with higher molar masses (PEG 550, PEG 1100) resulted in smaller hydrodynamic diameter that is a higher stability against aggregation processes that might be induced by plasma proteins although their adsorption could not be completely prevented. In addition, DLS measurements of particular GFC fractions (F12, F18) verified, that the hydrodynamic diameter increased slightly (fig. 2c,d). Therefore, one can conclude that the particles have a final hydrodynamic diameter of 10-15 nm in serum.

To characterize the relaxometric properties MR measurements were performed at 1.41 T (60 MHz) in order to investigate the impact of the coating with the various ligands on the ability of the nanoparticles to shorten the longitudinal relaxation time  $T_1$  and the transverse relaxation time  $T_2$  and thus whether the sample is suitable as a  $T_1$  contrast agent. We investigated the influence of the core size, the size of the ligand and induced aggregation on the  $T_1$  and  $T_2$  relaxation processes. A possible dependence of the contrast enhancement on the nature of the stabilizing surfactants has been reported recently.<sup>[13]</sup> Moreover, we investigated the impact of the slight increase in hydrodynamic diameter in serum on the relaxation processes. We determined the longitudinal ( $r_1$ ) and transverse ( $r_2$ ) relaxivities of the various samples by measuring the characteristic relaxation times of a concentration series and plotting the inverse relaxation time that is the relaxation rate against the ionic iron concentration. The

slope of the as determined straight line is defined as the relaxivity and represents the efficiency of the contrast agent. We determined the relaxivities of four individual samples which differ in the length of the used PEG chain. We used the same PEG molar masses as described above for the serum stability tests. Furthermore, we determined the relaxivity of a sample consisting of 6 nm sized iron oxide nanoparticles. Besides the absolute relaxivities of a contrast agent another useful factor is the value of  $r_2/r_1$  as it ascertains whether the considered sample acts as a  $T_1$  or a  $T_2$  contrast agent. For a  $T_1$  contrast agent  $r_2/r_1$  should be as small as possible.

First of all it can be seen from fig. 3a that all samples have comparable  $r_1$  values with respect to the size of the PEG chain whereas  $r_2$  strongly varies. This discrepancy in  $r_2$  is obviously due to aggregation effects which are known to be responsible for significant shortening of the transverse relaxation time.<sup>[35]</sup> Therefore, these results confirm the fact that a minimal PEG chain molecular mass of 550 g/mol is necessary in this case to synthesize individually dispersed particles in aqueous solution without any tendency to aggregation. However, the smallest hydrodynamic diameter below 10 nm was obtained using PEG 1100. In this case we measured a longitudinal relaxivity  $r_1=7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  and a  $r_2/r_1$  ratio of 2.4 at 1.41 T which makes this sample an ideal candidate for positive image generation at clinical relevant magnetic fields. For comparison, the relaxivities of the typical  $T_2$  contrast agent Resovist are  $r_1=11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $r_2=130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (1.41 T). Hence, our optimized contrast agent presented here has a comparable  $r_1$  value whereas  $r_2$  could be strongly limited. Moreover, Magnevist as a typical Gd based  $T_1$  contrast agent provides a  $r_1$  relaxivity of  $3.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  at 1.41 T which is significantly lower compared to our value. Furthermore our  $r_2/r_1$  ratio is comparable to other iron oxide contrast agents that are under investigation for MR angiography<sup>[16]</sup> and is the smallest value for PEG coated iron oxide nanoparticles. The use of larger polymers yielded samples with a higher  $r_2/r_1$  ratio thus demonstrating an increasing tendency to aggregation. This fact might be due to a less dense occupancy of the PEG chains on the nanoparticle surface. Fig. 3b points up that the hydrodynamic diameter strongly correlates with  $r_2/r_1$ .

In order to check whether the particles remain their relaxometric properties under physiological conditions we measured the relaxation times in FCS. We observed that the adsorption of plasma proteins to the particle surface does not change the spin-lattice and spin-spin relaxation times over a period of 24 h, a fact that points once more out that the particles remain individually dispersed. We also determined the relaxation times of the same GFC fractions which have been investigated by DLS (fig. 2c,d) of the PEG 1100 sample incubated

in FCS for 2 h. We measured a spin-lattice relaxation time  $T_1=911$  ms and a spin-spin relaxation time  $T_2=369$  ms. The  $T_1/T_2$  ratio was 2.5 and thus closed to the  $r_2/r_1$  ratio that was determined in water (2.4). Therefore, one can conclude that the particles fully remain their magnetic and relaxometric properties although plasma proteins adsorb and thus slightly increase their hydrodynamic diameter.

As the use of PEG 1100 lead to most satisfactory results in terms of stability and relaxivity we used this polymer in order to investigate the impact of a slight increase in the iron oxide core size from 4 to 6 nm. We observed an increase of both longitudinal and transverse relaxivity.  $r_1$  increases to  $13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  while  $r_2$  increases to  $42 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  at 1.41 T resulting in a  $r_2/r_1$  ratio of 3.2. Interestingly, this small size difference of 2 nm results in a 2.5-fold increase of the transverse relaxivity and a 2-fold increased in the longitudinal relaxivity, while the hydrodynamic diameter remains at approximately 10 nm. In contrast, the use of 4 nm sized particles and the short PEG 350 chain results in a significant increase in the hydrodynamic diameter to 30 nm due to clustering of individual particles. At the same time,  $r_2$  increases to  $39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  whereas  $r_1$  even decreases to  $5.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . This demonstrates that although a clustering in solution leads to an increase of  $r_2$ ,  $r_1$  decreases at the same time. This might be due to the smaller surface of the cluster compared to homogeneously dispersed particles. A simple increase in core size results, on the other hand, to an increase in both  $r_2$  and  $r_1$ . This is probably a consequence of the higher saturation magnetization of the larger nanocrystals. However,  $r_2/r_1$  also increases with increasing core size. Therefore, our results suggest that there is indeed a size limit for the superparamagnetic core of approximately 5 nm if the particles should act as  $T_1$  contrast agent and that aggregation processes have to be completely prevented.

As a relevant biological system we investigated cytotoxic effects and cell uptake into J774 mouse macrophage cells. Macrophages are phagocytes that belong to the reticulo endothelial system (RES) and are predominantly localized in the liver, spleen and bone marrow. These cells are in particular interesting because each nanoparticle contrast agent applied would experience phagocytosis after certain time of circulation if there is no specify through biofunctionalization in terms molecular or cellular imaging or the particles exhibit hydrodynamic diameters below  $\sim 6$  nm thus allowing renal clearance. For a blood pool contrast agent circulation times should be long that is the contrast agent should provide low levels of phagocytosis. To estimate a biologically reasonable incubation concentration for the cytotoxicity investigations we made the following assumptions. Based on typical injection doses in a mouse experiment (0.2 ml injection volume, 2 mg Fe/ml concentration, 2 ml blood

volume) an incubation concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$  is referred to as biological relevant concentration in the further discussion. Hence, we performed a standard MTT assay with various incubation concentrations (0.2-200  $\mu\text{g Fe/ml}$ ) and investigated several PEG coated nanoparticle contrast agents as well as Resovist a clinically applied contrast agent based on iron oxide (fig. 4). As one would expect, the PEGylated nanoparticles provide low cytotoxicity and are comparable to Resovist, the clinical standard. This is in good agreement with previous investigations on iron oxide nanoparticles coated with PEG.<sup>[36]</sup> However, the particles coated with PEG 2000 lead to relevant reduction of the cell viability at the highest concentration.

Next we investigated phagocytosis of the PEGylated iron oxide nanoparticles by the J774 macrophages which are murine macrophages. Moreover, for a potential application as blood pool contrast agent it is essential to know whether the PEG coating results in a significant decrease of unspecific uptake into cells of the RES. Representative images of J774 macrophages which are stained with Prussian blue are shown in fig. 5. First, it can be noticed that all PEG coatings investigated here lead to a reduction of cell uptake compared to clinically used Resovist. However we also observed significant differences with respect to the length of the PEG chain we used. The lowest uptake level we found for the PEG 1100 coated nanoparticles. However, for the shorter (PEG 350) and longer (PEG 2000) chains we observed higher degrees of contrast agent uptake. The results are in good agreement with those obtained in the stability investigations described above, where the PEG 1100 coated nanoparticles lead to lowest increase in hydrodynamic diameter that is the highest resistance against the adsorption of plasma proteins.

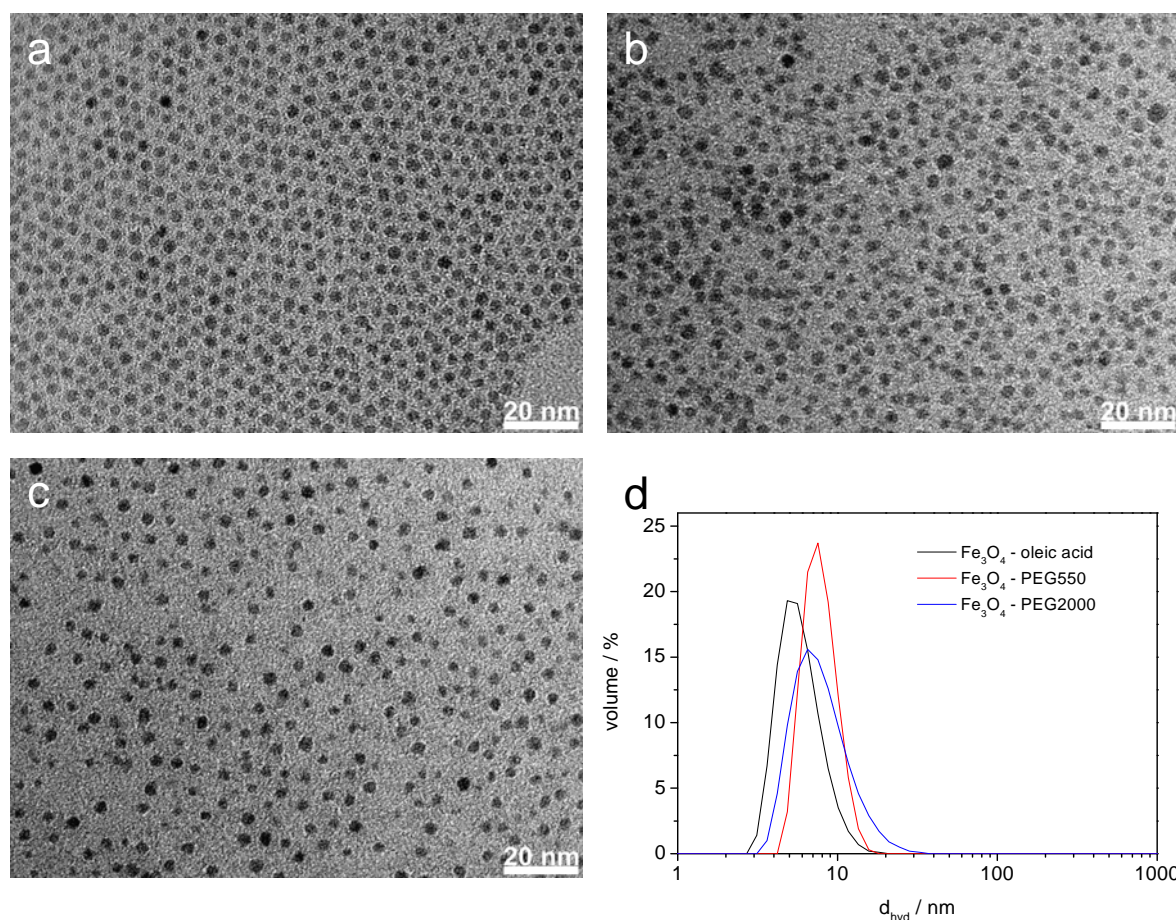
In conclusion, we synthesized a potential  $T_1$  blood pool contrast agent based on very small iron oxide nanoparticles (4 nm core size). Although a coating with PEG 1100 could not completely avoid the adsorption of serum proteins the increase in hydrodynamic diameter was small and, more important the particles fully remain their relaxometric properties under these conditions. The final hydrodynamic diameter in serum is  $\sim 10\text{-}15$  nm. The smallest possible  $r_2/r_1$  ratio was 2.4 at clinical field strength (1.41 T) and is thus comparable or even lower than other iron oxide based systems with citrate as charge stabilizing ligand which are under investigation for  $T_1$  weighted MRI. In addition, the  $r_1$  relaxivity is comparable to clinically used iron oxide based Resovist while  $r_2$  is a factor of seven lower and could therefore be strongly limited a fact that is required for  $T_1$  weighted MRI. On the other hand,  $r_1$  is approximately two times higher than that of Magnevist. However, to the best of our knowledge it is the smallest  $r_2/r_1$  ratio for PEGylated iron oxide nanoparticles reported so far. Our results furthermore suggest that to form a  $T_1$  contrast agent out of iron oxide the core size



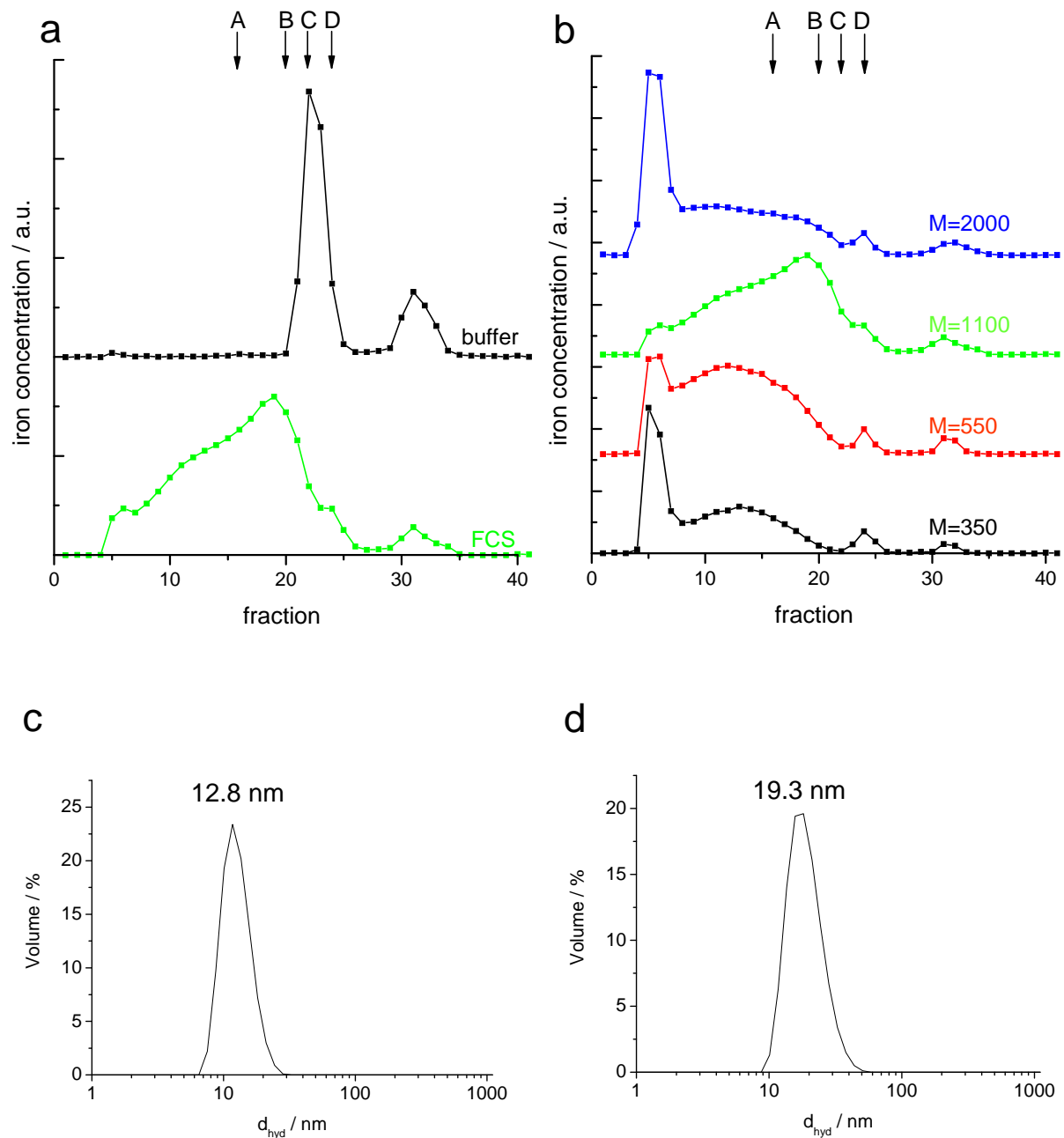
of approximately 5 nm has to be used. If the particle core size is too small the  $r_1$  values are relatively low. An increase of the core size on the other hand leads to an increase in both  $r_1$  and  $r_2/r_1$ . Thus, core sizes larger than 6 nm are excluded in terms of application as  $T_1$  contrast agent. As an advantage, the iron oxide contrast agent we presented provides low cytotoxicity as preliminary *in vitro* tests demonstrate and furthermore provide low levels of unspecific uptake into cells of the RES. Under all parameters tested, the PEG 1100 coated iron oxide nanoparticles (core size 4 nm) present an optimum providing highest stability together with suitable relaxometric properties, lowest cytotoxicity and lowest uptake into macrophages.

Acknowledgments. Oliver Bruns was supported by a fellowship from the Studienstiftung des Deutschen Volkes.

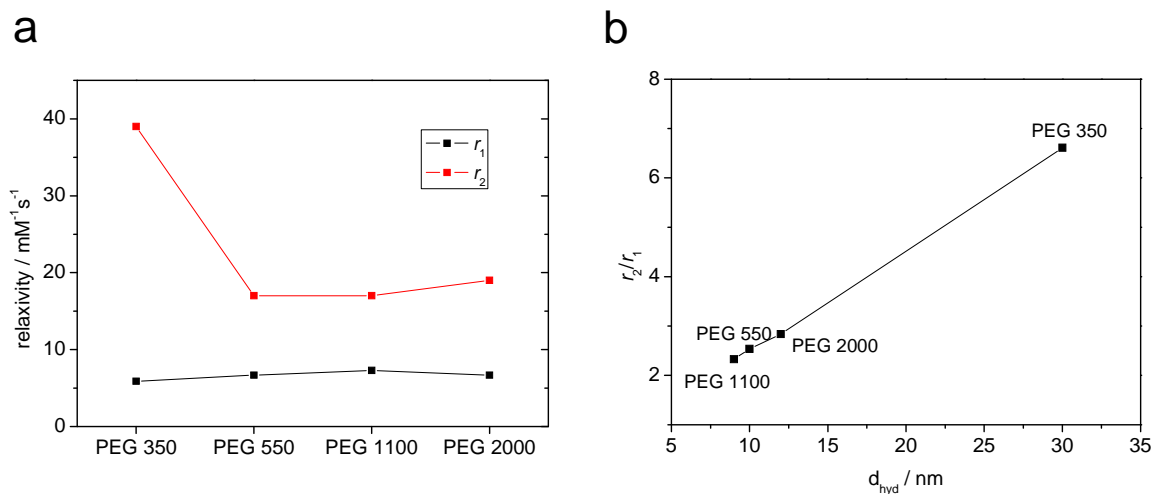
Supporting Information available. Detailed experimental procedures.



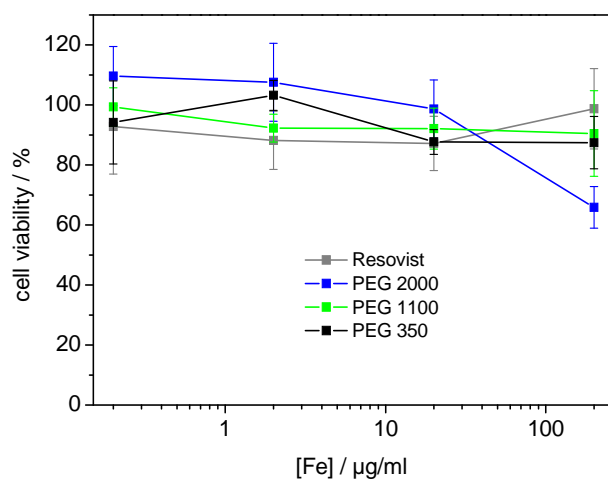
**Figure 1.** TEM images of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles (4 nm core size) coated with oleic acid (a), PEG 550 (b) and PEG 2000 (c). An increasing distance between the particles with increasing polymer chain length is observable. Together with the DLS results (d) one can conclude that no aggregation occurs during the ligand exchange procedure. A Hydrodynamic diameter of 10 nm seems reasonable assuming a simple addition of the core size and the calculated hydrodynamic diameter of a PEG 2000 molecule ( $d_{\text{eff,PEG}} = 0.03824 M_W^{0.559}$  according to ref.<sup>[32]</sup>).



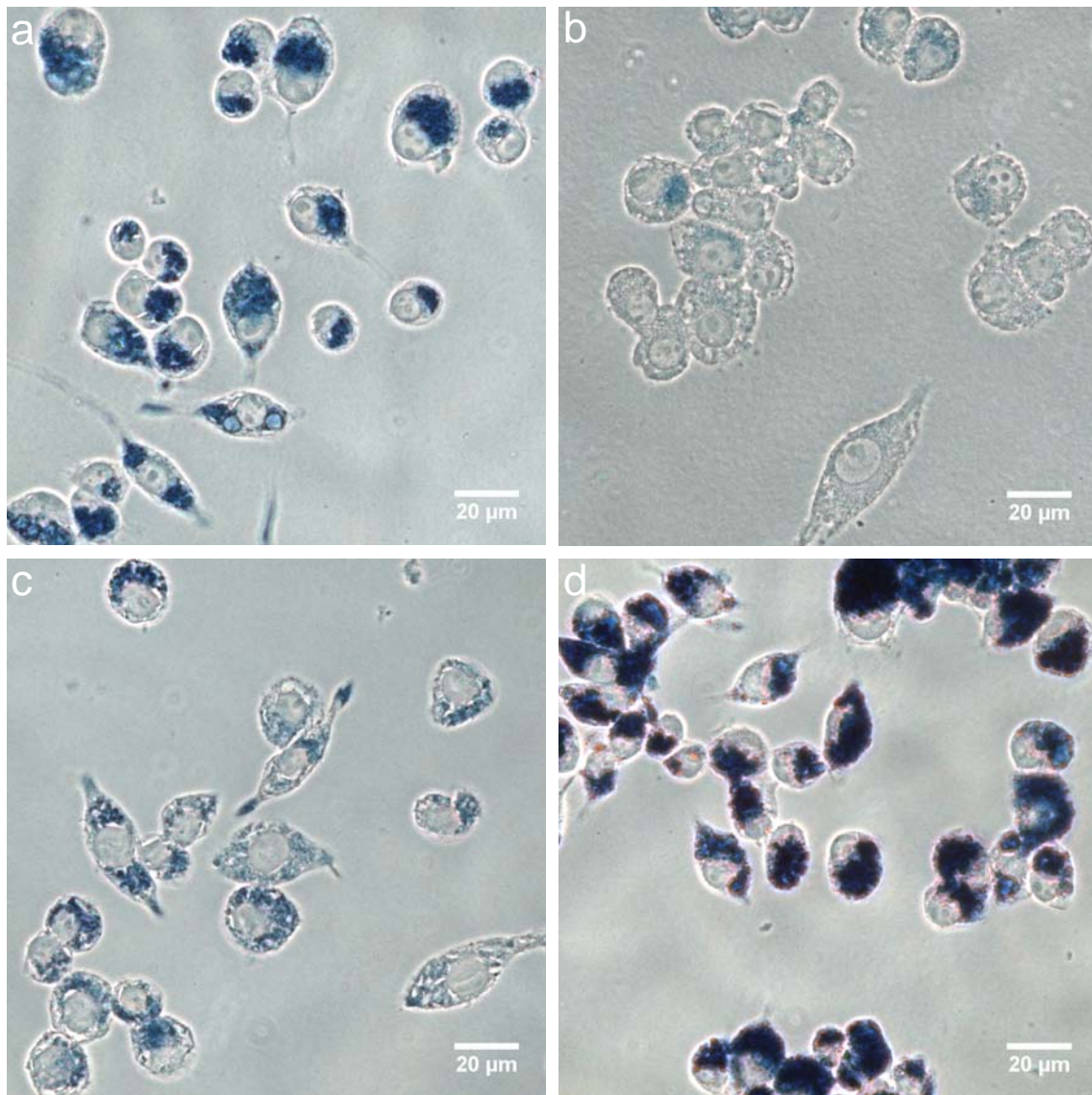
**Figure 2.** GFC analysis of the PEG coated nanoparticles: a) GFC curves of PEG1100 coated nanoparticles incubated for 2 h in buffer (black) and FCS (red). b) Comparison of various PEG chain lengths in terms of stability in FCS (2 h, 37 °C). The highest stability against the adsorption of plasma proteins was observed for PEG 1100 coated nanoparticles. MW markers A (Thyroglubulin, 669 kDa), B (Apoferritin, 443 kDa), C (Amylase, 200 kDa), D (Albumin, 66 kDa) are shown by arrows. DLS measurements of the GFC fractions F18 (c) and F12 (d) show a slight increase in the hydrodynamic diameter although no aggregation takes place.



**Figure 3.** a) Longitudinal and transverse relaxivity of nanoparticles coated with PEG based ligands of different size. b) The value of  $r_2/r_1$  strongly correlates with the hydrodynamic size of the particles in solution: For PEG 350 coated particles the tendency to aggregation ( $d_{\text{hyd}}=30$  nm) results in significantly higher  $r_2/r_1$  ratio.



**Figure 4.** MTT cytotoxicity assay for J774 macrophages incubated with various PEG coated iron oxide nanoparticles for 24 h. As a reference Resovist was used. Even at high iron concentrations (200  $\mu\text{g/ml}$ ) PEG 1100 and PEG 350 coated nanoparticles remain non-toxic. PEG 2000 leads to reduced cell viability at this concentration level.



**Figure 5.** Prussian blue staining of J774 macrophages at an iron incubation concentration of 200 µg/ml after 24 h of incubation. Different levels of intracellular contrast agent uptake are clearly observable for the various samples: PEG 350 (a), PEG 1100 (b), PEG 2000 (c) and clinical standard Resovist (d). PEG 1100 coated iron oxide nanoparticles show the lowest degree of unspecific uptake due to the dense PEG coating in good agreement with the stability tests shown above.

## References

- [1] A. Bjornerud, L. Johansson, *Nmr in Biomedicine* **2004**, *17*, 465.
- [2] J. W. M. Bulte, D. L. Kraitchman, *Nmr in Biomedicine* **2004**, *17*, 484.
- [3] Y. X. J. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *European Radiology* **2001**, *11*, 2319.
- [4] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2293.
- [5] E. Toth, L. Helm, A. E. Merbach, *Contrast Agents I* **2002**, *221*, 61.
- [6] H. B. Na, J. H. Lee, K. J. An, Y. I. Park, M. Park, I. S. Lee, D. H. Nam, S. T. Kim, S. H. Kim, S. W. Kim, K. H. Lim, K. S. Kim, S. O. Kim, T. Hyeon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 5397.
- [7] H. Ai, C. Flask, B. Weinberg, X. Shuai, M. D. Pagel, D. Farrell, J. Duerk, J. M. Gao, *Advanced Materials* **2005**, *17*, 1949.
- [8] J. Kim, J. E. Lee, S. H. Lee, J. H. Yu, J. H. Lee, T. G. Park, T. Hyeon, *Advanced Materials* **2008**, *20*, 478.
- [9] J. H. Lee, Y. M. Huh, Y. Jun, J. Seo, J. Jang, H. T. Song, S. Kim, E. J. Cho, H. G. Yoon, J. S. Suh, J. Cheon, *Nature Medicine* **2007**, *13*, 95.
- [10] E. Schellenberger, J. Schnorr, C. Reutelingsperger, L. Ungethum, W. Meyer, M. Taupitz, B. Hamm, *Small* **2008**, *4*, 225.
- [11] U. I. Tromsdorf, N. C. Bigall, M. G. Kaul, O. T. Bruns, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, R. A. Sperling, R. Reimer, H. Hohenberg, W. J. Parak, S. Forster, U. Beisiegel, G. Adam, H. Weller, *Nano Letters* **2007**, *7*, 2422.
- [12] O. T. Bruns, H. Ittrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, J. Lauterwasser, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, M. Merkel, N. C. Bigall, S. Sapra, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Weller, A. Eychmüller, G. Adam, U. Beisiegel, J. Heeren, *Nature Nanotechnology* **2009**.
- [13] H. W. Duan, M. Kuang, X. X. Wang, Y. A. Wang, H. Mao, S. M. Nie, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 8127.
- [14] E. Taboada, E. Rodriguez, A. Roig, J. Oro, A. Roch, R. N. Muller, *Langmuir* **2007**, *23*, 4583.
- [15] S. Wagner, J. Schnorr, H. Pilgrim, B. Hamm, M. Taupitz, *Investigative Radiology* **2002**, *37*, 167.
- [16] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, *Investigative Radiology* **2004**, *39*, 625.
- [17] J. G. Penfield, R. F. Reilly, *Nature Clinical Practice Nephrology* **2007**, *3*, 654.
- [18] L. Josephson, J. M. Perez, R. Weissleder, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 3204.

- [19] J. M. Perez, L. Josephson, R. Weissleder, *Chembiochem* **2004**, *5*, 261.
- [20] A. Roch, Y. Gossuin, R. N. Muller, P. Gillis, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293*, 532.
- [21] S. W. Kim, S. Kim, J. B. Tracy, A. Jasanoff, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4556.
- [22] M. S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Forster, H. Weller, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 6577.
- [23] A. F. Thunemann, D. Schutt, L. Kaufner, U. Pison, H. Mohwald, *Langmuir* **2006**, *22*, 2351.
- [24] M. Lattuada, T. A. Hatton, *Langmuir* **2007**, *23*, 2158.
- [25] J. Xie, C. J. Xu, Z. H. Xu, Y. L. Hou, K. L. L. Young, S. X. Wang, N. Pourmand, S. H. Sun, *Chemistry of Materials* **2007**, *19*, 1202.
- [26] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou, S. Sun, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3163.
- [27] S. Z. Sun, Hao; Robinson, David B.; Raoux, Simone; Rice, Philip M.; Wang, Shan X.; Li, Guanxiong, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 273.
- [28] J. Xie, S. Peng, N. Brower, N. Pourmand, S. X. Wang, S. H. Sun, *Pure and Applied Chemistry* **2006**, *78*, 1003.
- [29] S. H. Sun, H. Zeng, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 8204.
- [30] M. A. White, J. A. Johnson, J. T. Koberstein, N. J. Turro, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 4504.
- [31] Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, *Chemical Communications* **2008**, 2553.
- [32] R. A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kudera, M. Zanella, C. A. J. Lin, W. H. Chang, D. Braun, W. J. Parak, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 11552.
- [33] H. Wu, H. Zhu, J. Zhuang, S. Yang, C. Liu, Y. C. Cao, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 3730.
- [34] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nature Biotechnology* **2007**, *25*, 1165.
- [35] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Hogemann, R. Weissleder, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 816.
- [36] A. K. Gupta, S. Wells, *Ieee Transactions on Nanobioscience* **2004**, *3*, 66.

## Supporting Information

### Towards the development of a $T_1$ MR contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles

*Ulrich I. Tromsdorf, Oliver T. Bruns, Sunhild C. Salmen, Ulrike Beisiegel, and Horst Weller*

Synthesis of iron oxide nanoparticles of 4 and 6 nm core size: The nanoparticles were synthesized according to ref.<sup>[26-28]</sup>.

Synthesis of mPEG-PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>: Phosphorylation was proceeded according to ref.<sup>[29]</sup> with slight modifications: 5 mmol of the desired polymer were degassed under vacuum at 80 °C for 1h. After cooling down to room temperature 15 ml of tetrahydrofuran were added and the resulting solution was cooled with an ice bath. Under vigorous stirring 0.6 ml of POCl<sub>3</sub> were dropwise added. The resulting clear solution was then stirred at room temperature for several hours. The reaction was quenched through the addition of water and the product was extracted with chloroform. Finally, the polymer was dried under vacuum.

Water solubilisation of iron oxide nanocrystals: ligand exchange of the native capping molecules against mPEG-PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> was carried out as follows: 10 mg of nanoparticles prepared in step 1 were dissolved in 0.3 ml of THF. 50 µl of the polymer were dissolved in 1ml of water containing 40 µl of 1 M KOH solution. The resulting mixture was heated to 60 °C for 12 h. THF was then removed under a flow of nitrogen and the resulting aqueous solution filtered through a 0.2 µm syringe filter. To remove excess polymer the sample was purified through 3 cycles of concentration/dilution using a Vivaspin 10000 MW cutoff spin concentrator at 4000g.

Gel Filtration Chromatography: GFC was performed using a Superose-6 10/300 GL column (Amershan Bioscience). A flow rate of 0.5 ml/min was applied. For iron detection 200 µl of each fraction was treated with 50 µl of 5 M hydrochloric acid at 70 °C for 30 minutes. Afterwards, to 50 µl of each as prepared fraction 150 µl of a 2 M acetate buffer solution (pH=4.8) containing 10 % ascorbine solution were added followed by 100 µl of solution containing 50 mg bathophenanthroline per 50 ml. After 15 minutes absorption was measured at 540 nm.



Dynamic light scattering: Dynamic light scattering was carried out using a Malvern Zeta Sizer Nano-ZS. All measured samples were filtered through a Vivaspin 300000 MW cutoff spin concentrator (4000g) to remove aggregates before measurement. For each sample the obtained hydrodynamic diameter was averaged over three measurements.

MR measurements: A minispec mq-60 NMR Analyzer (Bruker, Germany) was used to measure the characteristic relaxation times at 1.41 T. For the determination of the longitudinal relaxation time  $T_1$  an inversion-recovery sequence was applied. The obtained data points were fitted using the equation  $M(TI)=M_0(1-\exp(-TI/T_1))$  where TI is the delay time after the considered inversion pulse,  $M(TI)$  the NMR signal intensity at the inversion time TI and  $M_0$  the equilibrium signal intensity before the application of any inversion pulse. For the determination of the transverse relaxation time  $T_2$  a CPMG multi echo spin echo sequence was applied at an echo time of 0.3 ms.

Cytotoxicity tests: Murine macrophages (J774) were cultured on a 96 well plate with 10,000 cells per well in RPMI 1640 + Glutamax with 10% FCS, 25 mM Hepes and 0.5% Penicillin-Streptomycin. Iron oxide nanocrystals and Resovist as reference were added to the medium to obtain following concentrations of iron in the wells (200  $\mu\text{g/ml}$ , 20 $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  and 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) and incubated for 24 hours. The incubation medium was removed and replaced by fresh medium containing 0.5 mg/ml MTT. Cells were kept for 3 more hours under culture conditions, next the MTT-containing medium was removed and the cells were lysated with DMSO and absorbance was measured at 540 and 620 nm.

Iron staining/SPIO uptake: J774 cells at a density of 50,000 cells per well were cultured on a glass cover slip in a 24-well plate in RPMI 1640 + Glutamax with 10% FCS, 25 mM Hepes and 0.5% Penicillin-Streptomycin. To compare the unspecific uptake different SPIO preparations were added to obtain the following concentrations in the medium (200  $\mu\text{g/ml}$ , 20 $\mu\text{g/ml}$  and 2  $\mu\text{g/ml}$ ) and incubated for 24 hours. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. To stain the intracellular iron the fixed cells were incubated at 37°C with 2 ml Prussian blue solution comprising equal volume of 2% hydrochloric acid aqueous solution and 2% potassium ferrocyanide (II) trihydrate for 30 min. After washing the cells once with PBS they were mounted on a microscope slide with fluoromount.

*Film zur Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels mit dynamischer MRT-Bildgebung*

Auf der CD ist ein Film als avi-Datei gespeichert. Dieser Film ist als „Supplementary Movie 1, Teil der „Supplementary Information“ der Publikation in Nature Nanotechnology. Die Datei heißt „nnano.2008.405-s2.avi“ und kann mit dem Windows Media Player geöffnet werden.

## *Danksagung*

Mein herzlicher Dank geht an

Prof. Beisiegel und Prof. Weller für die Betreuung meiner Dissertation. Insbesondere für die großen Offenheit bei der Entwicklung dieser interdisziplinären Fragestellung und den Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas.

Jörg und Alex für die herzliche und konstruktive Betreuung und hilfreichen Diskussionen und Tipps im Labor, die für den erfolgreichen Abschluss der Arbeit unverzichtbar waren.

Joachim, Birgit, Carla und Karo für die tolle Zusammenarbeit in unserer kleinen Nanogruppe.

die Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion und die Möglichkeit interessante Kontakte auf den Doktorandenforen zu knüpfen.

Ulli für die freundschaftliche und sehr fruchtbare Kooperation.

Rudi, Heinz, Martin, Barbara, Harald, Kersten, Michael, Nadja, Marija, Sameer, Christian, Kolya, Stephen für die tolle Zusammenarbeit, die meinen Horizont über die klassische Biochemie hinaus erweitert und mich unheimlich bereichert hat.

Wolfgang für die hilfreichen Tipps und Diskussionen zur biologischen Anwendung von Nanokristallen und Martin für die Einführung in die *in vivo* Untersuchungen des Lipoproteinstoffwechsels.

Carles, Maria und Anna für die Unterstützung während der interessanten und bereichernden Monate in Barcelona.

Alex, Jan, Doro, Annette, Sebastian und Anika gilt mein Dank für die vielen hilfreichen Diskussionen und fröhlichen Stunden im Labor.

Marino für die unvergleichliche Pizza und Kjell für die Idee mit dem Kickertisch...

Alexander, Christine, Dieter, Sandra, Dorte, Birgit, Ana, Klaus, Roland, Rainer, Rosi, Peter, Barbara, Andreas und Sandra sowie allen anderen Kollegen im IBM II für die tolle Stimmung und nette Atmosphäre, in der das Arbeiten wirklich Spass macht!

## *Lebenslauf*

**Oliver Bruns, geboren am 6. Januar 1980 in Hamburg**

### **Schule**

- 1999: Abitur am Wilhelm-Gymnasium in Hamburg  
1996-2000: Ausbildung zum Chemisch-Technischen-Assistent in Hamburg

### **Zivildienst**

- 2000: Krankenhaus Bethanien in Hamburg

### **Studienzeit**

- 2000-2005: Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg  
2002: Vordiplom Biochemie/Molekularbiologie  
2005: Diplom in Biochemie/Molekularbiologie  
Seit 2005: Promotion am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### **Stipendien und Auszeichnungen**

- Seit 2006 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes (Promotionsstipendium)  
2006: Auszeichnung für eines der besten Diplome im Studiengang Biochemie/Molekularbiologie  
2007: Young Investigator Award, 30th annual Meeting of European Lipoprotein Club  
2008: Young Investigator Award, 77th European Atherosclerosis Congress, 2008, Istanbul, Türkei

## Publikationen

1. Boldt K, **Bruns OT**, Gaponik N, and Eychmüller A, *Comparative Examination of the Stability of Semiconductor Quantum Dots in Various Biochemical Buffers*, Journal of Physical Chemistry B, 110(5):1959-63, 2006
2. Redecke L, von Bergen M, Clos J, Konarev PV, Svergund DI, Fittschen UEA, Broekaert JAC, **Bruns O**, Georgieva D, Mandelkow E, Genov N, and Betzel Ch *Structural Characterization of  $\beta$ -Sheeted Oligomers formed on the Pathway of Oxidative Prion Protein Aggregation in vitro*, Struct Biol. 2007 Feb;157(2):308-20.
3. Perbandt M, **Bruns O**, Vallazza M, Lamla T, Betzel Ch and Erdmann VA, *High Resolution Structure of Streptavidin in Complex with a Novel High Affinity Peptide Tag Mimicking the Biotin Binding Motif*, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2007 Jun 1;67(4):1147-53
4. Tromsdorf UI, Bigall NC, Kaul MG, **Bruns OT**, Nikolic MS, Mollwitz B, Sperling RA, Reimer R, Hohenberg H, Parak WJ, Förster S, Beisiegel U, Adam G and Weller H, *Size and Surface Effects on the MRI Relaxivity of Manganese Ferrite Nanoparticle Contrast Agents*, Nano Letters, 2007 Aug;7(8):2422-7.
5. Muñoz Javier A, Kreft O, Semmling M, Kempster S, Skirtach AG, **Bruns OT**, del Pino P, Bedard M, Rädler J, Käs J, Plank C, Sukhorukov GB, Parak WJ, *Uptake of colloidal polyelectrolyte coated particles and polyelectrolyte multilayer capsules by living cells*, Advanced Materials, 2008 Nov; 20 (22): 4281-4287
6. **Bruns OT**, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Lauterwasser J, Nikolic MS, Mollwitz B, Merkel M, Bigall NC, Sapra S, Reimer R, Hohenberg H, Weller H, Eychmüller A, Adam G, Beisiegel U, Heeren J, *Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals*, Nat Nanotechnol. 2009 Mar;4(3):193-201.
7. Tromsdorf UI, **Bruns OT**, Salmen S, Beisiegel U and Weller H, *Towards the development of a T1 MR contrast agent based on very small PEGylated iron oxide nanoparticles*, in Vorbereitung
8. **Bruns OT**, Beisiegel U and Heeren J, *Nanosomes: A new tool to non-invasively study postprandial lipoprotein metabolism in vivo*, in Vorbereitung

## Vorträge auf internationalen Kongressen:

1. Nanocrystals for molecular imaging in cell biology, 23. Januar 2006, SPIE Photonics West, San Jose, Kalifornien, USA
2. Biomarkierung mit hydrophoben Nanoteilchen, 27. Mai 2006, Bunsentagung 2006, Erlangen
3. Quantum dots for labeling of lipoproteins in cell biology, 28. Januar 2007, SPIE Photonics West, San Jose, Kalifornien, USA

4. Quantum dots for imaging of lipoproteins in vitro and in vivo, 15. Mai 2007, 27. Blankenese Konferenz, Hamburg
5. Non-invasive In Vivo Imaging of Recombinant TRL Labelled with Nanocrystals, 6. September 2007, 30. Jahrestreffen des European Lipoprotein Club, Tutzing
6. Non-invasive In Vivo Imaging of Recombinant Lipoproteins Labelled with Nanocrystals, 18. September 2007, Molecular Lifesciences 2007, Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg
7. Non-invasive in vivo imaging of recombinant postprandial lipoproteins labelled with nanocrystals, 8. Dezember 2007, XV Lipid Meeting, Leipzig
8. Non-invasive in vivo and multi-modal ex vivo imaging of lipoproteins labeled with nanocrystals, 19. Januar 2008, SPIE Photonics West, San Jose, Kalifornien, USA
9. Non-Invasive In Vivo Imaging of Recombinant Postprandial Lipoproteins Labelled with Nanocrystals, 77th European Atherosclerosis Congress, 28. April 2008, Istanbul, Türkei

#### **Eingeladene Vorträge im Rahmen von wissenschaftlichen Seminaren:**

10. Nanoteilchen - Neue Materialien für das molekulare Imaging, 5. Oktober 2005, Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Technische Universität Dresden
11. Biomarkierung mit hydrophoben Nanoteilchen, 13. Juni 2006, 4. Schwerpunkttreffen der Norddeutschen Initiative Nanomaterialien, Hamburg
12. Nanokristalle für das Imaging von postprandialen Lipoproteinen in vitro und in vivo, 12. Juni 2007, MOIN-Treffen, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel
13. Nanoparticles for biomedical imaging, 9. Mai 2008, The National and International seminar series, Umeå University, Schweden
14. Lipophilic Nanocrystals for Multi-modal Bioimaging, 28. August 2008, Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Technische Universität Dresden

#### **Vorträge im Rahmen von Veranstaltungen der DFG:**

15. Interactions of Hydrophobic and Hydrophilic Semiconductor Quantum Dots with Cell Model Systems for Liver and Adipose Tissue - NANOFATE, 14. Februar 2008, Kick-Off Meeting, DFG-Schwerpunktprogramm 1313: Biological Responses to Nanoscale Particles, Fulda
16. Transport und Lokalisation lipophiler Nanoteilchen in Tiermodellen und zellulären Systemen – von der Organverteilung bis zur intrazellulären Ultrastruktur, 24. November 2008, Workshop Zellbiologie/Biofunktion, DFG-Schwerpunktprogramm 1313: Biological Responses to Nanoscale Particles, Hamburg

17. Detektion von Halbleiter und magnetischen Nanokristallen in Zellen und Geweben – Probleme und Lösungsansätze, 18. Dezember 2008, Workshop Zellbiologie/Biofunktion, DFG-Schwerpunktprogramm 1313: Biological Responses to Nanoscale Particles, Berlin

**Eigene Poster auf internationalen Kongressen:**

1. Bruns OT, Mollwitz B, Bigall N, Kaul MG, Nikolic MS, Laatsch A, Weller H, Eychmüller A, Beisiegel U, Heeren J, Lipoproteins labelled with quantum dots: New tools for in vitro and in vivo experiments, 57. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 6. - 8. April 2006, Mosbach
2. Bruns OT, Mollwitz B, Bigall N, Kaul MG, Nikolic MS, Capek R, Gaponik N, Laatsch A, Weller H, Eychmüller A, Beisiegel U, Heeren J, Lipoproteins labelled with fluorescent and superparamagnetic nanocrystals: New tools for in vitro and in vivo experiments, XIV International Symposium on Atherosclerosis, 18. - 22. Juni 2006, Rom, Italien
3. Bruns OT, Mollwitz B, Laatsch A, Merkel M, Nikolic MS, Weller H, Eychmüller A, Heeren J, Beisiegel U, Quantum Dots for imaging of Lipoproteins in vitro and in vivo, 58. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 29. - 31. April 2007, Mosbach
4. Bruns OT, Mollwitz B, Laatsch A, Merkel M, Nikolic MS, Weller H, Eychmüller A, Heeren J, Beisiegel U, Quantum dots for imaging of lipoproteins in vitro and in vivo, 16. Mai 2007, 27. Blankenese Konferenz, Hamburg
5. Bruns OT, Itrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Mollwitz B, Merkel M, Reimer R, Hohenberg H, Weller H, Heeren J, Beisiegel U, Non-Invasive In Vivo Imaging of Recombinant Postprandial Lipoproteins Labelled with Nanocrystals, 77th European Atherosclerosis Congress, 26. – 29. April 2008, Istanbul, Türkei

## *Erklärung*

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 9. Juni 2009

Oliver Thomas Bruns



## *Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge*

<b>Chemikalien</b>	<b>Gefahrensymbol</b>	<b>R-Sätze</b>	<b>S-Sätze</b>
Albumin Fraktion V	-	-	-
Ascorbinsäure	-	-	-
Bathophenanthrolin	-	-	-
Chloroform	Xn	22-38-40- 48/20/22	36/37
Dodecan	Xn	65	23.2-24-62
Ethanol	F	11	7-16
Glutaraldehyd	T, N	22-23-34-42/43- 50	26-36/37/39- 45-61
Heparin	-	-	-
Kaliumhexacyanoferrat(II)- Trihydrat	-	52/53	50.1-61
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Mowiol	-	-	-
Natriumacetat	-	-	-
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38- 40-43	22-26-36/37
Salpetersäure 65%	C	35	23.2-26- 36/37/39-45
Salzsäure 5 mol/l	Xi	36/37/38	26
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63- 65-67	36/37-46-62
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	-	-	-
Wasserstoffperoxid 30%	Xn	22-41	26-39

## R-Sätze

- R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich.
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich.
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
- R 5 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- R 7 Kann Brand verursachen.
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
- R 10 Entzündlich.
- R 11 Leichtentzündlich.
- R 12 Hochentzündlich.
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser.
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft.
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosiver/leicht entzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- R 22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- R 23 Giftig beim Einatmen.
- R 24 Giftig bei Hautkontakt.
- R 25 Giftig bei Verschlucken.
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken.
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- R 30 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen.
- R 34 Verursacht Verätzungen.
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen.
- R 36 Reizt die Augen.
- R 37 Reizt die Atmungsorgane.
- R 38 Reizt die Haut.
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
- R 40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden.
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- R 45 Kann Krebs erzeugen.
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen.
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen.

- R 51 Giftig für Wasserorganismen.
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen.
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 54 Giftig für Pflanzen.
- R 55 Giftig für Tiere.
- R 56 Giftig für Bodenorganismen.
- R 57 Giftig für Bienen.
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht.
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- R 68 Irreversibler Schaden möglich.

#### Kombination der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase.
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.  
R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.  
R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.  
R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.  
R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.  
R 42/43 Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.  
R 48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.  
R 48/20/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.  
R 48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.  
R 48/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.  
R 48/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 48/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.  
R 48/23 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.  
R 48/23/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.  
R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.  
R 48/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.  
R 48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.  
R 48/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.  
R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.  
R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.  
R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.  
R 68/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.  
R 68/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.  
R 68/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

- R 68/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 68/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R 68/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 68/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

## S-Sätze

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren.
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S 3 Kühl aufbewahren.
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten.
- S 5 Unter ... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben).
- S 5.1 Unter Wasser aufbewahren.
- S 5.2 Unter Petroleum aufbewahren.
- S 5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren.
- S 6 Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben).
- S 6.1 Unter Stickstoff aufbewahren.
- S 6.2 Unter Argon aufbewahren.
- S 6.3 Unter Schutzgas aufbewahren.
- S 7 Behälter dicht verschlossen halten.
- S 8 Behälter trocken halten.
- S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen.
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
- S 14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben).
- S 14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten.
- S 14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten.
- S 14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S 14.12 Von Alkalien und basischen Substanzen fernhalten.
- S 14.2 Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen fernhalten.
- S 14.3 Von Eisen fernhalten.
- S 14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten.
- S 14.5 Von Säuren fernhalten.
- S 14.6 Von Laugen fernhalten.
- S 14.7 Von Metallen fernhalten.
- S 14.8 Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten.
- S 14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten.
- S 15 Vor Hitze schützen.
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S 18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen.
- S 22 Staub nicht einatmen.
- S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (Bezeichnung ist vom Hersteller anzugeben).

- S 23.1 Gas nicht einatmen.
- S 23.2 Dampf nicht einatmen.
- S 23.3 Aerosol nicht einatmen.
- S 23.4 Rauch nicht einatmen.
- S 23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden.
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
- S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife.
- S 28.3 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400.
- S 28.4 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 300 und Ethanol (2:1) und anschließend mit viel Wasser und Seife.
- S 28.5 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400.
- S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
- S 28.7 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife.
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen.
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben).
- S 40.1 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen.
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (Bezeichnung vom Hersteller anzugeben).
- S 43 Bei einem Feuer ... verwenden (die genaue Art der Brandbekämpfungsausrüstung angeben)  
Unter keinen Umständen Wasser verwenden.
- S 43.1 Zum Löschen Wasser verwenden.
- S 43.2 Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden.
- S 43.3 Zum Löschen Pulverlöschmittel verwenden - kein Wasser verwenden.
- S 43.4 Zum Löschen Kohlendioxid - kein Wasser verwenden.
- S 43.6 Zum Löschen Sand - kein Wasser verwenden.
- S 43.7 Zum Löschen Metallbrandpulver - kein Wasser verwenden.
- S 43.8 Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel verwenden - kein Wasser verwenden.
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S 47 Bei einer Temperatur von maximal ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S 47.1 Nicht bei Temperaturen über 25°C aufbewahren.

- S 48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 48.1 Feucht halten mit Wasser.
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 50.1 Nicht mischen mit Säuren.
- S 50.2 Nicht mischen mit Laugen.
- S 50.3 Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen.
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- S 56 Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S 60 Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist).

#### Kombination der S-Sätze

- S 1/2 Unter Verschluss aufbewahren.
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.
- S 3/9/14 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/9/14.1 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.
- S 3/9/14.1/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.
- S 3/9/14.2 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen aufbewahren.
- S 3/9/14.2/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen aufbewahren.
- S 3/9/14.3 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren.
- S 3/9/14.3/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren
- S 3/9/14.4 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.4/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.5 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S 3/9/14.5/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S 3/9/14.6 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.6/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.7 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.

- S 3/9/14.7/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.
- S 3/9/14.8 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S 3/9/14.8/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S 3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ° ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/9/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 3/14 An einem kühlen, von ... entfernten Ort aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/14.1 An einem kühlen, von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.2 An einem kühlen, von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.3 An einem kühlen, von Eisen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.4 An einem kühlen, von Wasser und Laugen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.5 An einem kühlen, von Säuren entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.6 An einem kühlen, von Laugen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.7 An einem kühlen, von Metallen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.8 An einem kühlen, von oxidierenden und sauren Stoffen entfernten Ort aufbewahren.
- S 7/8 Behälter trocken und dicht geschlossen halten.
- S 7/9 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 7/47 Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S 20/21 Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen.
- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- S 27/28 Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort abwaschen mit viel ..... (vom Hersteller anzugeben).
- S 29/35 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 29/56 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen und diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 36/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 47/49 Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).