

**Lokalisation und Quantifizierung
der Aufnahme
von Nanokristallen in der Leber**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Denise Bargheer
aus Nienburg/ Weser

Hamburg, Mai 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2011 bis Mai 2014 im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von PD Dr. Dr. Peter Nielsen angefertigt. Prof. Dr. Weller betreute diese Arbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: PD Dr. Dr. Peter Nielsen

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

Disputation: 08.08.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Superparamagnetische Eisenoxid Nanopartikel	2
1.1.1	Magnetresonanztomographie	2
1.1.2	Magnetische Eigenschaften	5
1.1.3	Anwendungsgebiete.....	7
1.2	Quantum Dots.....	9
1.2.1	Optische Eigenschaften	9
1.2.2	Anwendung in der Biomedizin.....	11
1.3	Verwendung von Radioaktivität in der Forschung und Medizin.....	13
1.3.1	Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Nanotechnologie	13
1.4	Spurenelementstoffwechsel	16
1.4.1	Chrom	16
1.4.2	Zink	17
1.4.3	Eisen.....	18
1.5	Ziele der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Synthese von Nanopartikeln	21
2.2.1	Synthese von SPIOs.....	21
2.2.2	Synthese von QDs	21
2.2.2.1	Radioaktive Synthese von CdSe/CdS/ ⁶⁵ ZnS/ZnS Teilchen.....	21
2.2.2.2	Radioaktive Synthese von Mn: ⁶⁵ ZnSe/ZnSe Teilchen.....	22
2.3	Überführung der Nanopartikel in wässrige Lösungen	23
2.3.1	Verpacken von Nanopartikeln in ein amphiphiles Polymer	23
2.3.2	Einbetten von SPIOs in rekombinante, triglyzeridreiche Lipoproteine (TRL).....	23
2.4	Austauschradiomarkierung von Nanopartikeln und Iodierung von Proteinen.....	24
2.4.1	Radiomarkierung der Nanokristalle	24
2.4.2	Iodierung von Transferrin	24
2.5	Untersuchungen zur Radiomarkierung der Nanokristalle.....	24
2.5.1	⁵¹ Cr-markierte SPIOs	24
2.5.1.1	Stabilität des ⁵¹ Cr-Labels unter sauren Bedingungen	24
2.5.2	⁶⁵ Zn-markierte Kern/Schale/Schale QDs.....	25
2.5.2.1	Überprüfung des Einbaus von ⁶⁵ Zn in ölsäurestabilisierte QDs	25
2.5.2.2	Stabilität des ⁶⁵ Zn-Labels unter pH-neutralen Bedingungen	25
2.6	Kopplung von Transferrin an SPIOs und QDs	26
2.7	Bioanalytik.....	27

2.7.1	Bestimmung der Eisenkonzentration.....	27
2.7.2	Größenausschlusschromatographie	27
2.7.3	Agarosegelelektrophorese	27
2.7.4	Messung der Radioaktivität.....	28
2.7.5	Photometrische Untersuchung.....	28
2.7.6	Proteinbestimmung nach Lowry	29
2.8	Zellkultur	29
2.8.1	J774-Zelllinie.....	29
2.8.2	α ML-12-Zelllinie	29
2.8.3	Nanopartikel-Aufnahme <i>in vitro</i>	29
2.8.4	Isolation von primären, murinen Hepatozyten	30
2.8.5	Isolation von primären nicht-parenchymalen Leberzellen	31
2.8.6	Immunzytochemische Färbungen	32
2.9	<i>In vivo</i> - Untersuchungen	32
2.9.1	Bluthalbwertszeit und Organverteilung.....	33
2.9.2	Herstellung von Kryoschnitten und immunhistochemische Färbungen...33	
2.10	Statistik	34
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Radiomarkierung und partikokinetische Untersuchungen von Nanopartikeln.....	35
3.1.1	Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr	35
3.1.2	Partikokinetische Untersuchungen von ^{51}Cr -SPIOs	40
3.1.3	Radiomarkierung von Qdots mit ^{65}Zn	48
3.1.3.1	Austauschmarkierung.....	48
3.1.3.2	Radioaktive Synthese von Quantum Dots.....	51
3.1.4	Partikokinetische Untersuchungen.....	55
3.2	Zellverteilung von Nanopartikeln	60
3.2.1	Untersuchung der Zellverteilung mit Hilfe von radiomarkierten Nanopartikeln.....	61
3.2.2	Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Zellverteilung.....	64
3.3	Funktionalisierung von Nanopartikeln	70
3.3.1	Oberflächenmodifikation mittels Kopplung eines spezifischen Liganden	70
3.3.2	Physiologische Funktionalisierung	79
4	Zusammenfassung	82
5	Summary.....	84
6	Anhang.....	86
6.1	Literaturverzeichnis.....	86
6.2	Abkürzungsverzeichnis	100

6.3	Abbildungsverzeichnis	103
6.4	Chemikalien	106
6.5	Sicherheits- und Gefahrenhinweise	107
6.6	Danksagung	109
6.7	Lebenslauf	110
6.8	Eidesstattliche Erklärung.....	112

1 Einleitung

Die Nanotechnologie gilt in der heutigen Zeit als moderne und zukunftsweisende Technologie, die auf der Entwicklung und Erforschung von Nanopartikeln beruht. Nanopartikel, das sind synthetisch erzeugte Nanomaterialien, die zwischen 1 und 100 nm groß sind. Sie werden aus verschiedensten Materialien hergestellt. Den weitaus größten Anteil machen Nanopartikel aus anorganischen Verbindungen aus. Hierzu gehören vor allem Edelmetalle, Halbleiter und Metalloxide, welche aufgrund ihrer kristallinen Struktur auch Nanokristalle genannt werden. Andere Verbindungen für die Herstellung von Nanopartikeln sind Kohlenstoffe und Polymere. Des Weiteren gibt es Nanopartikel, deren Aufbau man sich aus der Natur abgeschaut hat. Dazu zählen Mizellen oder Liposomen, welche aus organischen Verbindungen, wie Phospholipiden zusammengesetzt sind (Abbildung 1.1). Partikel in diesem Größenbereich haben außergewöhnliche Eigenschaften, die sich von Material mit der gleichen chemischen Zusammensetzung, aber größerer Partikel- oder Kristallgröße deutlich unterscheiden¹. Das liegt unter anderem an einem großen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis².

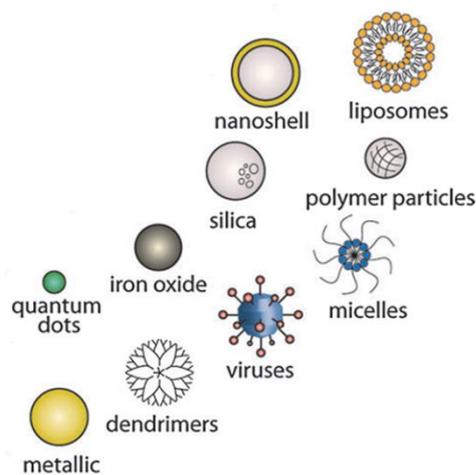


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Nanopartikeln. Abgebildet sind Nanopartikel aus verschiedenen Materialien. Adaptiert aus ³.

Genauso vielfältig wie die Materialien, aus denen die Partikel hergestellt werden, sind die Anwendungsbereiche. Nanopartikel finden sich in elektronischen Gegenständen, in Beschichtungen, in Anstrichfarben, in der Kosmetik und in den letzten Jahren mit zunehmender Bedeutung besonders in der Biomedizin wieder.

In der sogenannten Nanomedizin wird nachdrücklich an Nanomaterialien geforscht, die in der Lage sind, gezielt Orte zu erreichen (*targeting*), sie zu markieren (*labelling*) oder einen Wirkstoff an Diesen zu bringen (*drug delivery*). Häufige Anwendung finden in diesem Bereich superparamagnetische Eisenoxid Nanopartikel (*superparamagnetic iron oxide nanoparticle*, kurz SPION oder auch SPIO) und Halbleiter-Nanokristalle, sogenannte *Quantum Dots* (QD).

SPIOs werden aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften in der Medizin vor allem als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie eingesetzt. QDs zeichnen sich hingegen durch ihre einzigartigen optischen Eigenschaften aus und eignen sich in der Anwendung als Fluorophore.

Für die Anwendung im menschlichen Körper zur Diagnostik oder auch Therapie ist es wichtig Wege und Verhalten von Partikeln in biologischer Umgebung zu erkennen, um ihre physiologischen Auswirkungen beurteilen zu können. In der vorliegenden Arbeit sollten Nanopartikel unter anderem mittels Radiomarkierung näher *in vivo* untersucht werden. Im Folgenden wird deshalb ausführlich auf die Art der Teilchen und deren Eigenschaften eingegangen, sowie die Radiomarkierung als Methode zur Erforschung biomedizinischer Vorgänge beschrieben.

1.1 Superparamagnetische Eisenoxid Nanopartikel

SPIOs sind Nanopartikel mit einem kristallinen Kern aus Eisenoxid. Die gebräuchlichsten Formen sind Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). 1987 werden sie erstmalig als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie beschrieben. Man entdeckt, dass sie zur verbesserten Erkennung von Leber- und Milztumoren geeignet sind⁴⁻¹⁰. Der Großteil entwickelter SPIOs wird als negatives Kontrastmittel verwendet, sie lassen das sie umgebende Gewebe in magnetresonanztomographischen Aufnahmen dunkler erscheinen. Die Hintergründe dazu werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

1.1.1 Magnetresonanztomographie

Die Kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) gehört zu den spektroskopischen Methoden. Um ein NMR-Spektrum aufzuweisen, benötigt es nichtschwindende Kernspins. Alle Teilchen, die sich um ihre eigene Achse drehen (Eigendrehimpuls), also solch einen Kernspin besitzen, tragen permanente magnetische Dipolmomente. Auch Protonen bzw. ^1H -Kerne gehören zu diesen Teilchen. In Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes sind die magnetischen Kernmomente entartet, das heißt sie befinden sich in keiner bestimmten Anordnung. Wird jedoch ein äußeres Magnetfeld angelegt, kommt

es zur Ausrichtung der magnetischen Kerndipole. Teilchen mit der Kernspin-Quantenzahl $I = \frac{1}{2}$, wie Protonen, können zwei mögliche Orientierungen einnehmen. Sie können sich parallel (Zustand niedriger Energie) oder antiparallel (Zustand hoher Energie) zum Magnetfeld orientieren. Kernmagnetische Resonanzspektren basieren auf Übergänge zwischen diesen quantisierten magnetischen Kerndrehimpulszuständen.

In einem starken Magnetfeld B_0 in z-Richtung präzedieren die kernmagnetischen Momente um diese Achse mit der Larmorfrequenz ω_0 . Die Kernspins sind gemäß der Boltzmann-Statistik auf die energiearmen und energiereichen Zustände verteilt und es ergibt sich eine Magnetisierung in z-Richtung M_z . Die Einstrahlung eines oszillierenden Magnetfeldes B_1 senkrecht zu B_0 mit der Larmorfrequenz ω_0 induziert den Übergang in den energiereichen Kernspinzustand. In einem rotierenden Koordinatensystem verursacht dieser Resonanzfall eine Präzession des Magnetisierungsvektors M_z senkrecht zu B_0 , wodurch eine Magnetisierung in x,y-Ebene $M_{x,y}$ entsteht und M_z um diesen Betrag kleiner wird. Wird das Magnetfeld B_1 entfernt geht das Spinsystem wieder in die Boltzmann-Verteilung über. Vektor $M_{x,y}$ wird kleiner und der Magnetisierungsvektor M_z wird wieder größer (Abbildung 1.2).

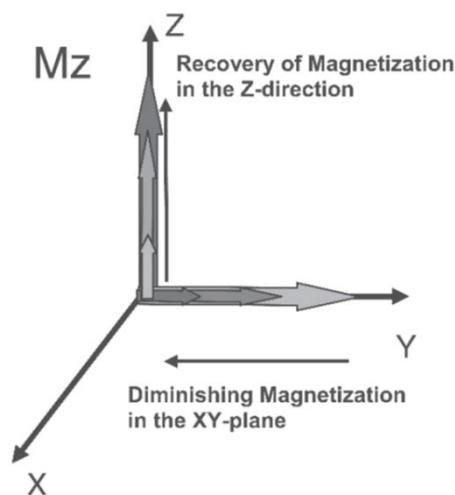


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Magnetisierung nach einem 90°-Puls und anschließende Relaxation. Übernommen aus ¹¹.

Zwei Arten in den Energiegrundzustand zurückzukehren, zu relaxieren, spielen in der NMR-Spektroskopie eine Rolle. Als longitudinale Relaxation bezeichnet man den Übergang in den Grundzustand, bei dem die abgegebene Energie von der Umgebung (Gitter) aufgenommen wird. Sie wird daher auch Spin-Gitter-Relaxation genannt. Dabei bezeichnet die longitudinale Relaxationszeit T_1 die Zeit, in der die bei Resonanz gestörte Magnetisierung M_z wieder auf den

Gleichgewichtswert relaxiert ist. Die zweite Art der Relaxation ist mit keiner Energieänderung verbunden. Beim Einschalten des B_1 -Feldes, in dem die Magnetisierung eine x,y -Komponente erhält, kreisen die Dipolmomente miteinander in Phase. Die Prozesse, die diese Phasenbeziehung stören und zum Verschwinden der Quermagnetisierung führen nennt man transversale Relaxation (Spin-Spin-Relaxation). Die transversale Relaxationszeit T_2 wird als die Zeit definiert, in der die Quermagnetisierung auf einen bestimmten Teil gesunken ist. Bei der effektiven Spin-Spin-Relaxationszeit T_2^* werden Inhomogenitäten des B_0 -Feldes, die zu lokalen Unterschieden in den magnetischen Feldern führen, berücksichtigt.

Der Verlust der $M_{x,y}$ Komponente kann als Funktion der Zeit nach Entfernen von B_1 gemessen und aufgezeichnet werden. Die Registrierung erfolgt durch eine Spule. In der Magnetresonanztomographie (MRT) werden diese Signale, welche aus Protonen-Relaxationszeiten gewonnen werden, in Schwarz-Weiß-Bilder übersetzt. Die Relaxationszeiten sind unter anderem abhängig von ihrer Umgebung, so dass unterschiedlich aufgebaute Gewebe unterschiedliche Signale liefern, wodurch eine Differenzierung der Organe möglich ist. Stärkere Kontraste zwischen verschiedenen Gewebearten können z.B. durch Variation von Pulssequenzen eines B_1 -Feldes oder mit der Gabe von Kontrastmitteln erreicht werden¹². Kontrastmittel, welche die longitudinale Relaxationszeit T_1 verkürzen und ein helles Bild erzeugen, werden als positive Kontrastmittel bezeichnet. Die meisten bisher beschriebenen SPIOs haben einen verkürzenden Einfluss auf die transversale Relaxationszeit T_2 , wodurch die Signalintensität sinkt und Bereiche, in denen sie sich ansammeln, dunkler werden lassen¹⁰. Sie gehören zu den negativen Kontrastmitteln.

SPIOs werden vom sogenannten „retikuloendothelialen System“ (RES) hauptsächlich der Leber und der Milz aufgenommen¹³⁻¹⁶. Der Begriff des RES ist heute aufgrund einer neuen Sicht auf die Abstammung phagozytierender Zellen veraltet und wurde vom Begriff des Mononukleären Phagozyten Systems (MPS) abgelöst^{17,18}. Da viele ältere Arbeiten jedoch noch die alte Bezeichnung verwenden, werden die Begriffe in dieser Arbeit synonym verwendet. Das MPS der Leber wird von ortsansässigen Makrophagen, den Kupffer-Zellen, und den sinusoidalen Endothelzellen, welche sogenannte *Scavenger* Rezeptoren aufweisen, gebildet. In der MRT-Diagnostik gebraucht man SPIOs üblicherweise zur Detektion und Darstellung von herdförmigen Leberläsionen und Tumoren, da diesen Arealen für gewöhnlich Kupffer-Zellen fehlen^{10,19,20}.

1.1.2 Magnetische Eigenschaften

SPIOs werden aufgrund ihrer starken Magnetisierung in einem Magnetfeld, die mit ihrem superparamagnetischen Verhalten verbunden ist, als Kontrastmittel in der MRT-Diagnostik verwendet. Um den Begriff des Superparamagnetismus zu erklären, benötigt es eine kurze Darstellung der existierenden magnetischen Eigenschaften. Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen magnetischen Phänomenen: Diamagnetismus, Paramagnetismus und kollektiver Magnetismus, der sich wiederum in Ferro-, Antiferro- und Ferrimagnetismus untergliedert.

Werden diamagnetischen Materialien in ein äußeres Magnetfeld gebracht, wird ein Strom induziert, welcher seinerseits ein schwaches Magnetfeld bewirkt und dem äußeren Magnetfeld entgegengerichtet ist. Das Maß für die Effizienz der Induktion ist die magnetische Suszeptibilität χ und ist für diamagnetische Materialien kleiner Null und temperaturunabhängig. Diamagnetismus wird beobachtet wenn nur gepaarte Elektronen vorhanden sind und sich folglich deren magnetische Momente aufheben.

Wenn in Atomen oder Molekülen ungepaarte Elektronen vorhanden sind tritt Paramagnetismus auf. Werden paramagnetische Materialien in ein äußeres Magnetfeld gebracht, wird ein Magnetfeld erzeugt, welches nach dem äußeren Magnetfeld ausgerichtet ist und dieses noch verstärkt. Zwar tritt auch Diamagnetismus auf, dieser ist jedoch viel schwächer. Ein weiterer Faktor, der der Ausrichtung nach dem äußeren Magnetfeld entgegenwirkt ist die thermische Energie, die die zufällige Ausrichtung der Spins der Elektronen begünstigt. Unterhalb einer bestimmten Temperatur T_C (auch: Curie-Temperatur) ist kein Paramagnetismus mehr zu beobachten, sondern es findet sich eine der drei genannten magnetischen Formen: Ferro-, Antiferro- oder Ferrimagnetismus (Abbildung 1.3). Die Ursache dafür ist, dass unterhalb T_C innerhalb kleiner Bereiche eines Kristalls die magnetischen Dipole der Spins richtenden Kräften ausgesetzt sind. Dadurch sind die Spins aller ungepaarten Elektronen parallel zueinander ausgerichtet. Die kleinen Bereiche werden als Weissche Bezirke oder Domänen bezeichnet.

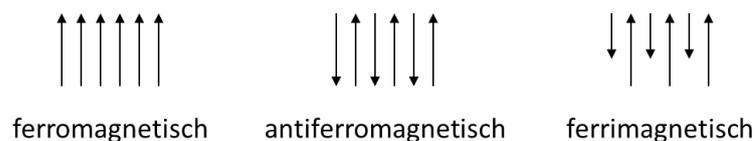


Abbildung 1.3: Darstellung der magnetischen Eigenschaften von Ferro-, Antiferro- und Ferrimagneten. Abgebildet sind die Orientierungen der magnetischen Momente innerhalb einzelner Bezirke.

In ferromagnetischen Systemen tritt eine spontane Ordnung der Spins in eine Richtung ein. Dies beruht auf sogenannten Austauschwechselwirkungen zwischen Elektronen. In einem Ferromagnet bleibt die Magnetisierung auch nachdem das äußere Magnetfeld entfernt wurde. Oberhalb der Temperatur T_C wird das Material paramagnetisch. In antiferromagnetischen Materialien führt die Austauschwechselwirkung dazu, dass die magnetischen Momente in eine antiparallele Ausrichtung gezwungen werden und sich gegenseitig aufheben. Es erfolgt keine Magnetisierung. Auch Antiferromagneten zeigen oberhalb der Temperatur T_N (hier Néel Temperatur) paramagnetisches Verhalten. Bei Ferrimagneten liegt ebenfalls eine antiparallele Ausrichtung der magnetischen Momente vor, jedoch gleichen sie sich nicht aus. Sie zeigen ein ähnliches Verhalten wie Ferromagneten und auch sie werden oberhalb der Temperatur T_C zu Paramagneten. Werden ferro- oder ferrimagnetische Stoffe in ein stärker werdendes äußeres Magnetfeld gebracht und die Feldstärke im Anschluss wieder gesenkt, so folgt die Magnetisierung abhängig von der äußeren Feldstärke einem veränderten Verlauf. Diesen Effekt bezeichnet man als Hysterese (Abbildung 1.4).

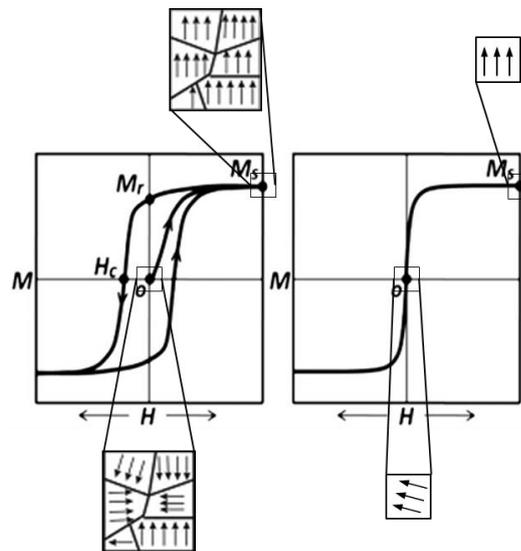


Abbildung 1.4: Idealisierte Magnetisierungskurven. Links: Ein Ferromagnet mit mehreren Weisschen Bezirken wird durch das Anlegen eines äußeren Feldes bis zur Sättigungsmagnetisierung M_s magnetisiert. Wird nun die Feldstärke auf null reduziert, fällt die Magnetisierung nicht ebenfalls auf null zurück, sondern es verbleibt eine sogenannte Remanenz M_r . Erst mit einem stärker werdenden gegenläufigen Magnetfeld erreicht man eine Sättigungsmagnetisierung in entgegengesetzter Richtung $-M_s$. Dabei durchläuft die Magnetisierung zwischenzeitlich bei der Koerzitivfeldstärke H_c den Wert Null. Wird die von außen angelegte Feldstärke nun wieder erhöht, ergibt sich ein punktsymmetrischer Verlauf der Magnetisierungskurve und bildet eine Schleife. Rechts: Unterhalb einer bestimmten Größe zeigen Ferromagneten mit nur einer Weiss Domäne Superparamagnetismus und keine Hysterese. Adaptiert aus ²¹.

Nanopartikel aus ferro- oder ferrimagnetischen Materialien und unterhalb einer bestimmten Größe (etwa 10-20 nm) weisen eine besondere Form des Magnetismus auf, den Superparamagnetismus²². Unterhalb einer bestimmten Größe des Partikels ist die Aufteilung in Bezirke energetisch nicht mehr begünstigt und es besteht nur noch aus einer einzelnen Domäne. Die Koerzitivfeldstärke H_C in der Hysterese ist von der Teilchengröße abhängig. Ein-Domänen-Teilchen haben im Vergleich mit Multi-Domänen-Teilchen sehr große Koerzitivfeldstärken. Wird jedoch eine gewisse Größe bei Ein-Domänen-Teilchen unterschritten wird die Koerzitivfeldstärke gleich Null und sie zeigen keine Hysterese mehr. Sie werden superparamagnetisch (Abbildung 1.4).

Demzufolge beruht der Superparamagnetismus von Eisenoxidpartikeln auf zwei kritischen Größen, der Struktur des Kristallgitters und dem Durchmesser des Partikels.

1.1.3 Anwendungsgebiete

Wie bereits erwähnt ist die Hauptanwendung von SPIOs als Kontrastmittel in der MRT angesiedelt. Beispiele von SPIOs in der klinischen Anwendung (i.v. Applikation) zur Bildgebung der Leber und der Milz sind Endorem® (Guerbet) und Resovist® (Bayer Healthcare Pharmaceuticals). Aufgrund rückgängiger Verkaufszahlen auf dem europäischen Markt ist Endorem® mittlerweile nur noch in den USA erhältlich und Resovist® wird nur noch in Japan verkauft²³. Zur verbesserten Bildgebung des Gastrointestinaltrakts verwendet man nicht absorbierbare SPIOs mit größeren Durchmessern von 300–3500 nm (orale Applikation; Lumirem®/GastroMARK®, Guerbet/AMAG Pharmaceuticals und Abdoscan®, GE Healthcare)²³. Weitere SPIOs zur Bildgebung von Lymphknoten, des Knochenmarks oder der Gefäße (Angiographie) sind noch in der klinischen Prüfung. Dazu zählen Sinerem® (Guerbet/AMAG Pharmaceuticals), Supravist® (Bayer Healthcare Pharmaceuticals) und Clariscan® (GE Healthcare) um nur einige zu nennen²³.

Weitere Anwendungsgebiete von SPIOs in der präklinischen Forschung oder auch schon in klinischen Prüfungsphasen sind der gezielte Wirkstofftransport in z.B. Tumore und die sogenannte Thermo-therapie. Ein passiver Transport von SPIOs in Tumorgewebe soll zum einen durch eine Verlängerung der Bluthalbwertszeit der Teilchen erreicht werden. Der Hintergrund ist, dass das fenestrierte Endothel von Blutgefäßen, welche Tumore umgeben, eine erhöhte Durchlässigkeit besitzt, was zu einer bevorzugten Anreicherung der langzirkulierenden Partikel im interstitiellen Raum des Tumors und schließlich zur Aufnahme in Tumorzellen selbst führen dürfte²². Zum anderen soll schon eine Aufnahme in Tumor-assoziierte Makrophagen in der Lage sein, den Tumor

zu markieren. Beobachtet wurde dies unter anderem klinisch in Lebermetastasen und experimentell in Hirntumoren²³⁻²⁶. Ein aktiver Transport von SPIOs soll die Anreicherung in Tumore noch verbessern. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass Krebszellen gewisse Rezeptoren überexprimieren. Die Funktionalisierung der SPIOs mit dafür spezifischen Liganden sollte demnach eine Akkumulation der SPIOs in das Tumorgewebe erhöhen und einen stärkeren Kontrast in der MRT mit sich bringen. Beispiele für solche Liganden sind das Vitamin Folat und der monoklonale Antikörper Herceptin® (Roche)²⁷⁻³⁰. Durch die Anreicherung von SPIOs in Tumore hat man ein potentielleres Trägermaterial für Arzneimittel, so dass SPIOs nicht nur zur Auffindung von Tumoren dienen, sondern gleichzeitig eine lokale Behandlung ermöglichen könnten. Dadurch würden im Vergleich zur systemischen Gabe die Effizienz des Arzneimittels erhöht und eventuelle Nebenwirkungen reduziert. So zeigten Quan et al. und Yu et al. in Tiermodellen am Beispiel von Doxorubicin beladenen SPIOs den aktiven Transport dieses Chemotherapeutikums in den Tumor und eine erhöhte therapeutische Wirkung im Vergleich zu freiem Doxorubicin^{31,32}. In der klinischen Anwendung sind solche multifunktionalen SPIOs jedoch noch nicht angekommen. Neben der Funktionalisierung des SPIOs als Träger von Arzneimitteln, können die Partikel selbst auch als Therapeutikum eingesetzt werden. Dies ist der Fall in der therapeutischen Hyperthermie, bei der Tumorgewebe auf bis zu 42 °C erwärmt und so dessen Zerstörung begünstigt wird. Eine direkte Injektion von SPIOs in den Tumor und anschließendes Anlegen eines alternierenden Magnetfeldes führen in nur dem SPIO umgebenden Tumorgewebe eben dazu und scheint in der Anwendung sicher und effektiv zu sein³³⁻³⁵.

Die bestehenden Methoden für die Synthese von SPIOs sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der heute angewendeten Methoden zur Herstellung von SPIOs. Tabelle übernommen aus ³⁶.

Methoden	Vorteile	Nachteile
Kopräzipitation	Einfache Synthese mit hoher Ausbeute	Gefahr der Oxidation und Aggregation
Hydrothermale Reaktion	Enge Größenverteilung und gute Kontrollierbarkeit, skalierbar	Lange Reaktionszeiten
Hochtemperatur Dekomposition	Gute Kontrollierbarkeit der Form und Größe, hohe Ausbeute	Hydrophobizität der Partikel nach der Synthese, Oberflächenmodifikation zur Überführung ins Wässrige notwendig
Mikroemulsion	Gute Kontrollierbarkeit der Partikelgröße	Geringe Ausbeute und Verwendung großer Mengen Lösungsmittel, Entsorgung großer Mengen oberflächenaktiver Stoffe

1.2 Quantum Dots

Quantum Dots (Qdots oder auch QDs) bestehen zumeist aus mindestens zwei Halbleitermaterialien mit einem zwiebelartigen Aufbau³⁷. Dabei bildet das innere Material den Kern und das äußere Material die Schale und die Partikel weisen so eine Kern/Schale Struktur auf. Erste Berichte über nanoskalige Halbleiterkristalle findet man in den frühen 1980er Jahren³⁸⁻⁴⁰. Daraufhin dauerte es etwa noch ein Jahrzehnt bis man sie als attraktives Werkzeug für biologische Anwendungen entdeckte. Auf die Gründe für eine vielseitige Einsetzbarkeit in der interdisziplinären Forschung wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

1.2.1 Optische Eigenschaften

Die Eigenschaften von Halbleitermaterialien werden für gewöhnlich anhand des Bändermodells erklärt. Es leitet sich vom Molekülorbitalmodell (MO-Modell) ab, welches die Bindungscharakteristika von Molekülen, also zwischen Atomen, veranschaulicht. Nach diesem Modell differenziert man zwischen energieärmeren bindenden und energiereicheren antibindenden MOs mit diskreten Energieniveaus. Es bilden sich immer so viele MOs wie Atomorbitale in die Bindung eingehen und die MOs werden in der Reihenfolge ansteigender

Energie besetzt. Dadurch entstehen oberste besetzte MOs, sogenannte HOMOs (*highest occupied molecular orbital*) und unterste unbesetzte MOs, LUMOs (*lowest unoccupied molecular orbital*). Die Energielücke zwischen HOMO und LUMO stellt die Energiemenge dar, die es für einen elektronischen Übergang von Elektronen benötigt. Einen Halbleiterkristall kann man sich wie ein sehr großes Molekül vorstellen, in dem entsprechend viele MOs vorhanden sind. Bei einer derart großen Anzahl an Energieniveaus wird der Abstand zwischen den Niveaus so klein, dass sich, bezogen auf die MO-Energie, ein Kontinuum bildet, welches schließlich als Band bezeichnet werden kann. Man unterscheidet dabei das mit Elektronen beladene Valenzband und das unbeladene Leitungsband. Valenzband und Leitungsband sind das Äquivalent zum HOMO und LUMO. Auch hier entscheidet der Abstand zwischen dem Valenz- und Leitungsband, welcher als Bandlücke bezeichnet wird, über die benötigte Energie für einen elektronischen Übergang von Elektronen.

Durch Anregung eines Elektrons mit entsprechender Energie, z.B. durch Absorption von Lichtenergie, kann es vom Valenzband ins Leitungsband überführt werden. Das Elektron hinterlässt dadurch ein Loch im Valenzband. Der Zustand dieses Elektron-Loch-Paares wird als Exziton bezeichnet⁴¹. Die aufgenommene Energie kann durch Emission von Licht und andere Relaxationsprozesse wieder abgegeben werden. Werden Halbleiterkristalle sehr klein, wie es bei QDs der Fall ist, tritt der Größenquantisierungseffekt auf^{41,42}. In diesem Fall ist der Bohrradius des Exzitons größer als der Teilchendurchmesser. Das Exziton ist in seiner Ausdehnung gefangen, wodurch die Bandlückenenergie steigt, je kleiner die Partikel sind. Die damit einhergehende Veränderung der Absorptions- und Emissionsmaxima ist der Grund, warum man durch die in der Synthese kontrollierbare Partikelgröße die Fluoreszenz einstellen kann (Abbildung 1.5).

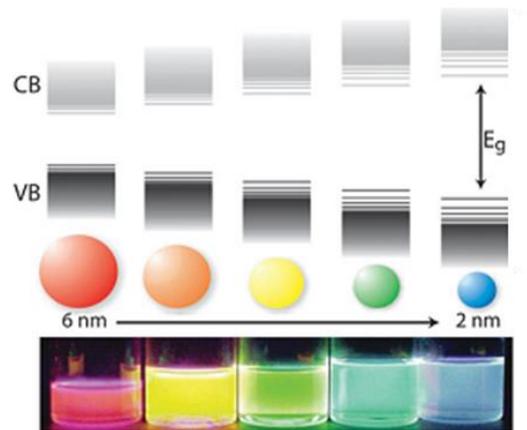


Abbildung 1.5: Darstellung des Größenquantisierungseffekts. Die Bandlückenenergie E_g zwischen Valenzband VB und Leitungsband CB steigt umgekehrt proportional zur Größe der Halbleiter-Nanokristalle. Entnommen aus ⁴³.

Das große Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis eines Nanokristalls hat jedoch zur Folge, dass die nach außen angrenzenden Atome viele freie Koordinationsstellen aufweisen. Solche Fehlstellen im Kristallgitter führen dazu, dass angeregte Elektronen strahlungslos in den Grundzustand zurückgehen können, wodurch die Fluoreszenzquantenausbeute (QY, *quantity yield*) gemindert wird. Um dieses Problem zu umgehen kann man die Oberfläche mit stabilisierenden Liganden versehen. Effektiver ist jedoch das Aufwachsen einer Schale mit einem zweiten Halbleitermaterial, wodurch die charakteristische Kern/Schale Struktur entsteht. Dadurch wird sowohl die QY als auch die Stabilität der Teilchen erhöht. Damit das gelingt dürfen sich jedoch die elektronischen und strukturellen Eigenschaften der beiden Halbleitermaterialien nicht zu stark unterscheiden. Die Lösung für dieses Problem kann eine zwischengelagerte Schale sein, die die Spannung zwischen Kern und äußerer Schale verringert³⁷. Ein typisches Beispiel für solche Kern/Schale/Schale Teilchen sind CdSe/CdS/ZnS QDs.

Die größeinstellbare Photolumineszenz, eine hohe Quantenausbeute, die gegenüber organischen Fluorophoren überlegene Photostabilität, sowie besonders schmale Emissionsspektren bei gleichzeitig breiten Exzitationsspektren führten dazu, dass man QDs in der Forschung als nützliches Werkzeug zur Visualisierung verschiedenster biologischer Prozesse entdeckte.

1.2.2 Anwendung in der Biomedizin

Quantum Dots haben mittlerweile einen festen Platz in bildgebenden Verfahren der naturwissenschaftlichen Forschung. Ihr Einsatzbereich ist vielfältig, sowohl *in vitro* also auch *in vivo*. Sie dienen dem *Labelling* von Zellen, intrazellulären

Strukturen, aber auch Biomolekülen und ermöglichen die Verfolgung physiologischer Vorgänge.

Bestimmte *in vitro*-Assays nutzen QDs für den Nachweis von z.B. Nukleinsäuren oder Proteinen, wo sich DNA-markierte QDs als sensitive Marker für die *in situ* Hybridisierung erweisen⁴⁴. Sowohl in fixierten als auch lebenden Zellen ließen sich Organellen, aber auch ganze Zellen markieren und über einen längeren Zeitraum verfolgen⁴⁵⁻⁵⁰. Lidke et al. zeigten mit Hilfe von QDs die Rezeptor-vermittelte Fusion und Internalisierung eines EGF-Rezeptors und Dahan et al. gelang es die Bewegung einzelner Glycin-Rezeptoren in der Membran neuronaler Zellen zu verfolgen^{51,52}.

Auch *in vivo* zeigten sich QDs als nützliche Hilfsmittel zur Darstellung verschiedenster Vorgänge. Dubertret et al. injizierten in Phospholipidmizellen eingebettete QDs in *Xenopus* Embryos und beobachteten QD-Fluoreszenz bis zum Stadium der Kaulquappe, über die sie eine gleichmäßige Verteilung der QDs von Mutter- auf Tochterzellen in der Embryogenese nachwiesen⁵³. Bruns et al. betteten QDs in rekombinante Lipoproteinmizellen ein und untersuchten damit den Transport und die Aufnahme von Lipoproteinen in Leberzellen⁵⁴. Die Krebsforschung erachtet QDs ebenfalls als interessantes Werkzeug zur Visualisierung von Tumoren oder Lymphknoten. Zahlreiche Studien beschreiben die Entwicklung von QDs, welche im nahen Infrarotbereich emittieren (NIRF, *near infra-red fluorescence*) und somit auch in tiefergelegenen Geweben detektiert werden können⁵⁵⁻⁵⁸. Die Anwendung solcher Teilchen erlaubten z.B. die intraoperative Visualisierung von Lymphbahnen und Wächterlymphknoten durch NIRF^{56,57,59}. Einem operierenden Chirurgen würde dieses Verfahren erleichtern, den Lymphknoten lokal klar abzugrenzen und so minimal-invasiv zu resezieren. Wie bei den SPIOs ist ein gezielter Transport von QDs in Tumore durch das Versehen mit spezifischen Liganden die Vision vieler in der Krebsforschung und wurde in Tiermodellen bereits erfolgreich durchgeführt⁶⁰⁻⁶². Die Technik ist jedoch nicht ausgereift, die unspezifische Aufnahme ins MPS muss weiter minimiert und die spezifische Aufnahme ins gewünschte Gewebe maximiert werden⁶³.

Aber auch wenn diese Hürden überwunden werden sollten, steht der klinischen Anwendung die Zusammensetzung der QDs entgegen. Der Grund dafür sind die meist toxischen Materialien, wie Cadmium, aus denen sie hergestellt sind und von denen Langzeitschäden erwartet werden⁶⁴. Seit einiger Zeit wird an der Entwicklung cadmiumfreier QDs geforscht, die vergleichbare optische Eigenschaften besitzen, mit denen man dieses Problem möglicherweise umgehen könnte⁶⁵⁻⁶⁷. Ausführliche pharmakokinetische und Toxizitäts-Studien sind also weiterhin für beide Arten von QDs erforderlich.

Den Synthesen von QDs liegen im Grunde dieselben Methoden zugrunde wie denen von SPIOs^{68,69}. Sie können sowohl in wässrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln synthetisiert werden. Der Vorteil bei der Herstellung in wässrigen Lösungen ist, dass die Teilchen direkt im wässrigen Medium stabil sind und man den Synthesemaßstab leicht vergrößern kann. Der Nachteil ist, dass die Teilchen eine breite Größenverteilung besitzen und nachbereitende Maßnahmen wie eine größenselektive Präzipitation erforderlich sind. Diese Probleme hat man z.B. bei der thermalen Dekomposition nicht. Die Synthese von QDs aus organometallischen Präkursoren in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln, wie sie 1993 die Arbeitsgruppe um Bawendi beschrieb, wird als Meilenstein in der Chemie von QDs bezeichnet^{70,71}. Teilchen, die aus solchen Synthesen stammen, zeichnen sich durch eine geringe Größenvariation aus. Um sie in wässrige Medien zu überführen, sind jedoch Oberflächenmodifikationen notwendig.

1.3 Verwendung von Radioaktivität in der Forschung und Medizin

Der ungarische Chemiker George de Hevesy (1885 – 1966) entwickelte Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts durch den Einsatz von ²¹²Pb zu Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Pb(NO₃)₂ in Pflanzen die *Radiotracer*-Technik⁷². Er gilt damit weitläufig als Erfinder der Nuklearmedizin^{73,74}. Die *Radiotracer*-Technik erlaubt die einfache Verfolgung und quantitative Erfassung eines radioaktiven Isotops in chemischen oder biologischen Systemen durch Detektion der radioaktiven Strahlung und dient somit zur Aufklärung des Aufenthaltsorts eines mit diesem Isotop markierten Stoffes. Die radioaktiven Nuklide werden heute zur Bildgebung in der Diagnostik, aber auch in der Therapie eingesetzt und sind aus der Nuklearmedizin nicht mehr wegzudenken. Im Zuge der sich rasch weiterentwickelnden Nanomedizin war die Idee, die Nanotechnologie mit der *Radiotracer*-Technik zu verbinden nur die logische Konsequenz.

1.3.1 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Nanotechnologie

In der Nanomedizin erhofft man sich bei der Anwendung von Nanopartikeln in vielen Fällen eine Verbesserung der bestehenden Methoden, z.B. in der Bildgebung oder im gezielten Transport von Pharmaka. Bei der Verwendung von radioaktiv markierten Nanopartikeln geht es vorrangig um die Entwicklung verbesserter Methoden in der Nuklearmedizin.

In den *Radiotracer*-basierten Bildgebungsverfahren unterscheidet man funktional zwischen planarer Szintigraphie, *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) und *Positron Emission Tomography* (PET)⁷⁵. Die bildgebenden Verfahren können vom Einsatz radiomarkierter Nanopartikel profitieren, da Partikel-charakteristische Eigenschaften eingebracht werden können. Bei der Verwendung von ⁶⁴Cu-radiomarkierten SPIOs beispielsweise kann man sowohl die hohe Sensitivität der PET als auch die hohe Auflösung der MRT nutzen. Die Arbeitsgruppe von Chen synthetisierte solch einen radiomarkierten SPIO, durch Anbringen eines ⁶⁴Cu-radiomarkierten Moleküls auf die Partikeloberfläche, zur Untersuchung der Integrin-Expression in Tumoren, das Transmembranprotein Integrin ist auf Tumorzellen überexprimiert⁷⁶. Die Studie bietet einen Ansatz für die Früherkennung von Tumoren in der Klinik. Die Zahl publizierter Studien, in denen radiomarkierte Nanopartikel Anwendung finden ist groß, dieses Anwendungsbeispiel soll jedoch zur Verdeutlichung ausreichen.

In der Forschung hat man die Vorteile des Gebrauchs von radiomarkierten Nanopartikeln nicht nur in einer verbesserten und quantitativen Detektion gesehen, sondern man kann sich auch Anwendungen in der Radiotherapie von Krebspatienten vorstellen. Bei dieser Art der Therapie nutzt man den Umstand, dass radioaktive Strahlung in Zellen freie Radikale erzeugt, welche zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führen können. Tumorzellen haben eine besonders hohe Teilungsrate und befinden sich dadurch häufiger in radiosensitiven Zellzyklusphasen wie der Mitose, wodurch vor allem das Tumorgewebe anfällig für Schäden durch die radioaktive Strahlung ist⁷⁷. In der Kombination mit Nanopartikeln erhofft man sich einen effizienteren Transport des *Radiotracers* zum Tumor und damit eine Möglichkeit die Strahlendosis für das gesunde Gewebe zu minimieren. Für die Radiotherapie scheinen vor allem Liposomen ein geeignetes Trägermaterial für den passiven oder aktiven Transport von *Radiotracer*n zu sein⁷⁸. Abbildung 1.6 zeigt wie man sich einen multifunktionalen Nanopartikel für diagnostische und therapeutische Zwecke vorstellen kann. Von den bis heute berichteten radiomarkierten Nanopartikeln befinden sich jedoch fast alle noch in der präklinischen Forschung⁷⁹.

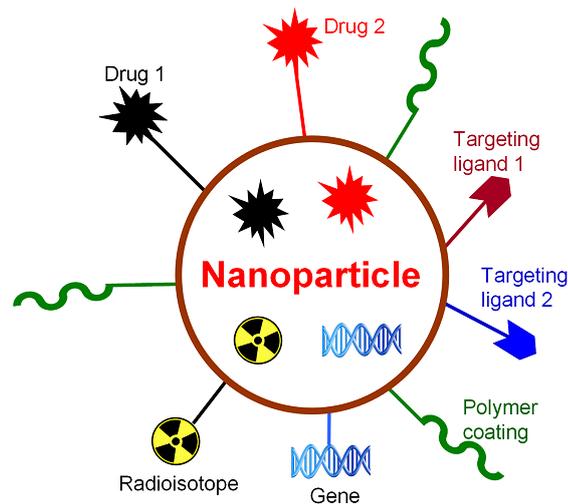


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines multifunktionalen Nanopartikels. Liganden für einen gezielten Transport, Wirkstoffe zur lokalen Behandlung und radioaktive Tracer zur Detektion oder Therapie können auf der Oberfläche angebracht und -im Falle von Mizellen oder Liposomen- auch im Inneren des Partikels eingebettet sein. Übernommen aus⁸⁰.

Mit der Voraussetzung, die alle Nanopartikel erfüllen müssen um es in die klinische Prüfung schaffen, kommen wir zum Ursprung der *Radiotracer* Technik zurück, die quantitative Verfolgung des radioaktiven Isotops in z.B. biochemischen Prozessen zur Aufklärung über dessen Verbleib. Für die Verwendung von (funktionalisierten) Nanopartikeln müssen pharmakokinetische, oder wie man bezüglich Nanopartikeln auch sagt, partikokinetische Parameter und der Verbleib der Partikel genau bestimmt werden und dafür eignet sich die Markierung der Teilchen mit einem radioaktiven *Tracer* besonders gut. Diesen Ansatz verwendete auch die Gruppe um Chen bei der Untersuchung des Transports von ^{64}Cu -markierten QDs und –SPIOs in Tumore, jedoch markierten sie die Partikel durch Anbringen eines radioaktiven Moleküls auf die Oberfläche^{76,81}. Sollte sich das *Label in vivo* vom Partikel lösen, spiegelt es nicht weiter die Verteilung des Nanopartikels wieder. Deshalb ist es von Vorteil, wenn man den Kern selbst markiert, wie es einige Gruppen bereits getan haben. Beispielsweise wurden SPIOs so mit ^{59}Fe markiert. Weissleder et al. verwendeten dazu ^{59}Fe -markierte Ausgangsstoffe zur Synthese von ^{59}Fe -radiomarkierten SPIOs⁹. Zhu et al. und Alexiou et al. unterzogen die Nanopartikel einer postsynthetischen Neutronenaktivierung^{82,83}. Freund et al. wählten ebenfalls eine postsynthetische Radiomarkierung. Sie inkubierten SPIOs in einem organischen Lösungsmittel nachträglich mit einem ^{59}Fe -Salz^{84,85}. Radiomarkierungen von QDs wurden ebenso publiziert. Woodward et al. und Sun et al. radiomarkierten die QDs jeweils durch radioaktive Synthesen, zum einen mit ^{125m}Te , zum anderen mit ^{109}Cd ^{86,87}. Mit der *Radiotracer* Technik ist es auf leichte Art möglich die physiologische

Verteilung, eine Umverteilung durch eventuellen Abbau und die mögliche Ausscheidung von Abbauprodukten oder unprozessierter Stoffe quantitativ zu erfassen.

1.4 Spurenelementstoffwechsel

In der vorliegenden Arbeit werden Tierversuche mit ^{51}Cr -, ^{65}Zn - und ^{59}Fe -markierten Nanopartikeln beschrieben. Dabei werden Transportprozesse diskutiert, die teilweise spezifisch für diese Spurenelemente sind. Im Folgenden wird kurz auf die einzelnen Elemente eingegangen.

1.4.1 Chrom

Ende der 1950er Jahre wurde Chrom als ein essentielles Spurenelement für Säugetiere beschrieben, welches eine Rolle im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel spielen soll. Ein halbes Jahrhundert später sind intra- sowie interzelluläre Transportwege weiterhin unbekannt, eine Beschreibung von Transportern dreiwertiger Metallionen ist in der Literatur nicht zu finden und die Wirkung von Chrom als regulatorischer Faktor wird mittlerweile in Frage gestellt. Dennoch gibt es Anzeichen dafür, dass eine Interaktion von Chrom mit Biomolekülen im Organismus existiert, die jedoch weiterer Abklärung bedarf. Zum jetzigen Zeitpunkt werden zwei biologisch aktive Formen von Chrom diskutiert. Zum einen das Oligopeptid *low-molecular-weight chromium-binding substance* (LMWCr), welches auch als Chromodulin bezeichnet wird und vier Chromionen bindet. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Chromodulin die Kinase von Membranfragmenten, welche den Insulinrezeptor enthielten, aktivierte. Die andere biologisch aktive Form, Chromat, soll im Körper enzymatisch aus Cr^{3+} -Ionen hergestellt werden und hemmend auf die Protein Tyrosin Phosphatase (PTP), welche ihrerseits den Insulinrezeptor inhibiert, wirken. Zwei mögliche Wirkungsorte für die Chrom-Biomoleküle im Insulinsignalweg werden zurzeit für möglich gehalten, am Insulinrezeptor und an der Proteinkinase B, welche auch als Akt bekannt ist (Abbildung 1.7)⁸⁸.

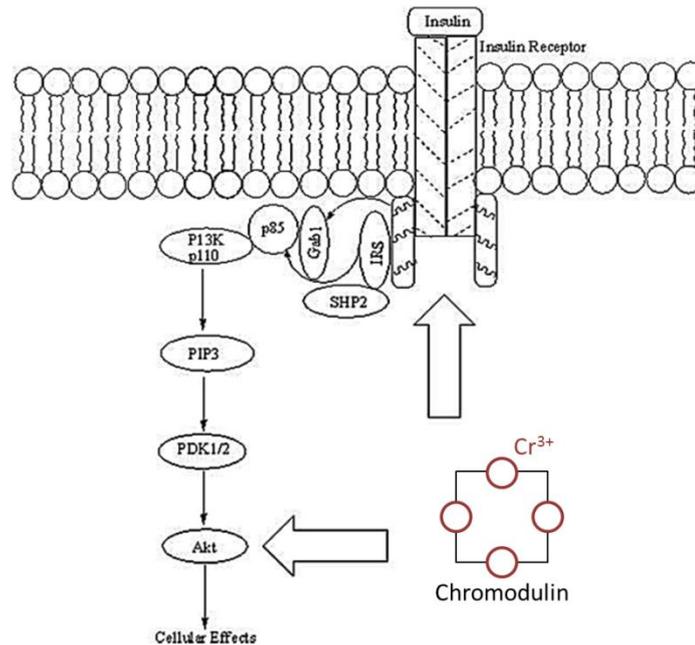


Abbildung 1.7: Vorgeschlagene Wirkungsorte für Chromodulin (Pfeile) in der Insulinsignalkaskade. Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zur Autophosphorylierung der intrazellulären Beta-Untereinheit des Rezeptors, wodurch er in eine aktive Tyrosinkinase umgewandelt wird. Er katalysiert unter anderem die Phosphorylierung von Mitgliedern der Insulin Rezeptor Substrate (IRS). IRS interagieren mit Signalmolekülen über sogenannte SH2 Domänen, dazu gehört auch die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Die Untereinheit p85 von PI3K assoziiert mit IRS1 oder Gab1, wodurch die katalytische Untereinheit p110 aktiviert wird. Eine nachfolgende Signalkaskade über Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) und der PIP3 abhängigen Kinase (PDK) aktiviert Akt, welche ihrerseits verschiedene Zellvorgänge aktiviert oder auch hemmt. Modifiziert aus ⁸⁸.

1.4.2 Zink

Das Spurenelement Zink ist essentiell für die Struktur und Funktion sehr vieler Proteine wie Enzymen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Es wurde außerdem gezeigt, dass es Neurotransmitter-ähnlich an der Signalübermittlung beteiligt sein kann und auch intrazellulär Eigenschaften eines Signalmoleküls, wie etwa Calcium, aufweist⁸⁹. Alle biologischen Funktionen werden durch eine starke Kontrolle der intrazellulären Zinkkonzentration aufrechterhalten.

Zink wird über Enterozyten im Dünndarm aufgenommen und über die pankreatische Sekretion ausgeschieden. Im Vergleich ist die renale Ausscheidung sehr gering, in der Niere findet eine umfangreiche Reabsorption statt⁹⁰. Intra- und extrazelluläre Zinkkonzentrationen werden über ein Zusammenspiel von Methallothioneinen (MT) und Zinktransportern reguliert. Zwei Klassen von SLC (*solute-linked carrier*)-Genen kodieren für Zinktransporter, daher werden sie in zwei Familien unterteilt. Zinktransporter der SLC30-Familie (ZnT) setzen die intrazelluläre Konzentration von Zink

Da es keine kontrollierten Ausscheidungsmechanismen gibt, lediglich einen natürlichen Verlust durch Abschilferung von Zellen, wird die Eisenhomöostase durch eine sehr genaue Regulation der Absorption im Dünndarm aufrechterhalten. Nicht Häm-gebundenes Eisen wird gegebenenfalls von einer Ferrireduktase in der Membran der duodenalen Enterozyten reduziert und als Fe^{2+} vom Divalenten Metalltransporter DMT1 in die Zelle aufgenommen⁹³. Häm-Eisen aus Fleischprodukten wird über das *Heme Carrier Protein* HCP1 in die Enterozyten transportiert⁹⁴. Ein Teil des aufgenommenen Eisens wird an Ferritin gebunden in den Zellen gespeichert, während das übrige Eisen eine Translokation in den Blutstrom über den Eisenexporter Ferroportin erfährt (Abbildung 1.9 A.). Schlüsselenzym für die Regulierung der Eisenaufnahme in den Blutstrom ist Hepcidin. Die Bindung von Hepcidin an Ferroportin bewirkt eine Internalisierung und Degradation von Ferroportin und wodurch der Transport von Eisen in den Blutkreislauf unterbunden wird. Gelangen die zweiwertigen Eisenionen hingegen in die Zirkulation werden sie entweder über Ceruloplasmin oder Hephaestin oxidiert und anschließend an das Apotransferrin gebunden, welches so zu Holotransferrin wird⁹². Das etwa 80 kDa große Glykoprotein kann insgesamt zwei Fe^{3+} -Ionen binden. Mit der Zirkulation transportiert das beladene Transferrin das Eisen zu den Zellen, wo es durch die Bindung an Transferrin-Rezeptoren (TfR) zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose kommt. Der Transferrin-Rezeptor 1 wird in nahezu allen (proliferierenden) Zellen exprimiert, der Transferrin Rezeptor 2 dagegen hauptsächlich in Hepatozyten^{95,96}. Die Freisetzung des Eisens von Transferrin erfordert die endosomale Ansäuerung, danach werden die Eisenionen im Endosom durch die Ferrireduktase Steap3 reduziert und anschließend über DMT1 ins Zytosol der Zelle geschleust. Der Transferrin-TfR-Komplex wird wieder an die Zellmembran geführt, wo sich Apotransferrin vom Rezeptor löst und wieder neu beladen werden kann (Abbildung 1.9 B.)⁹⁷.

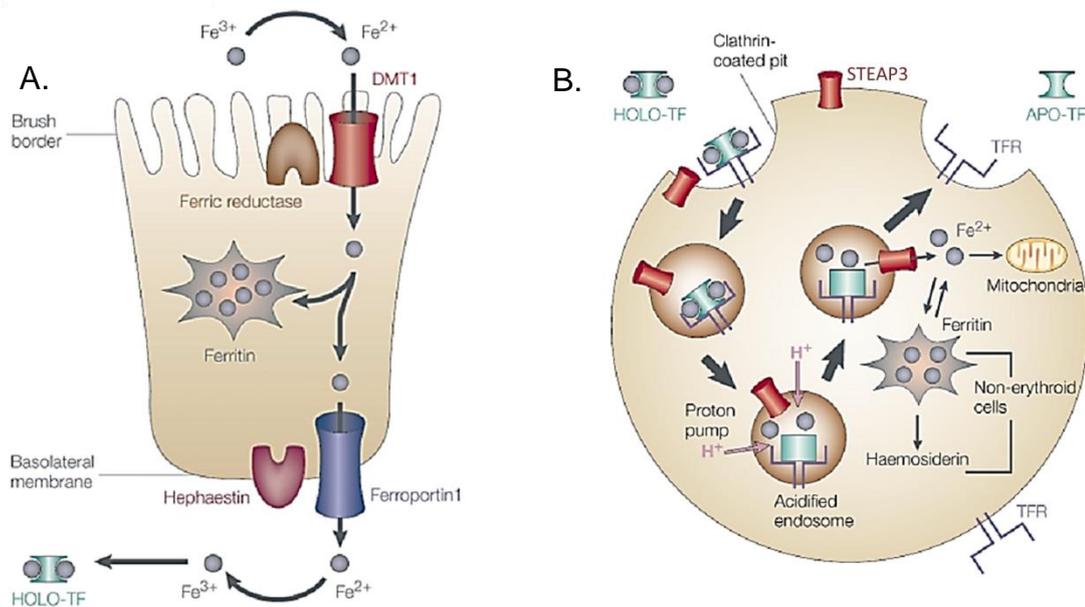


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Transportwege von Eisen. A.) Aufnahme von Eisen in Enterozyten des Dünndarms durch DMT1 und darauffolgender Transport durch Ferroportin in den Blutkreislauf. Ein Teil des aufgenommenen Eisens wird in den Zellen an Ferritin gebunden gespeichert. B.) Mit Eisen beladenes Transferrin bindet an den Transferrin Rezeptor und wird im Komplex endozytiert. Das Eisen wird freigesetzt und der Zelle zur Verfügung gestellt. Der unbeladene Transferrin-TfR-Komplex tritt wieder an die Zellmembran, wo sich Transferrin vom Rezeptor löst. Adaptiert aus⁹⁸.

Die Hauptmenge des Eisens wird von heranreifenden roten Blutkörperchen (Erythrozyten) für die Bildung von Hämoglobin benötigt. Eisen gealterter Erythrozyten wird recycelt, indem Zellen des MPS die Erythrozyten phagozytieren und degradieren und das von ihnen freigesetzte Eisen entweder vorerst speichern oder wieder in den Umlauf bringen⁹⁹.

1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten SPIOs und QDs mit unterschiedlichen *Radiotracer* markiert werden, um neue Erkenntnisse über die Verteilung und den Verbleib dieser Nanopartikel *in vivo* und *in vitro* zu erhalten, da besonders in Bezug auf QDs viele partikokinetische Fragen, wie die nach dem Abbau, noch ungeklärt sind. Es sollte zudem ein detailliertes Bild über die Aufnahme und die daraus folgende Zellverteilung beider Nanoteilchen erstellt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch eine Modifizierung der Oberfläche mit Biomolekülen eine Funktionalisierung der Partikel möglich ist. Es sollte geprüft werden, wie sich funktionalisierte Nanopartikel *in vivo* verhalten und ob mit Hilfe der Oberflächenmodifikation ein verändertes Aufnahmemuster beobachtet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (USA), Merck (Deutschland) oder Carl Roth (Deutschland) bezogen. Zellkultur-Medien und -Lösungen stammen von Invitrogen, USA.

2.2 Synthese von Nanopartikeln

2.2.1 Synthese von SPIOs

Die in der Arbeit verwendeten SPIOs wurden im Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg (AG Weller) nach Yu et al. synthetisiert und für die Durchführung der Experimente zur Verfügung gestellt¹⁰⁰.

2.2.2 Synthese von QDs

Nicht radiomarkierte QDs und solche, die für die postsynthetische Radiomarkierung verwendet wurden, stellte das Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Dresden (AG Eychmüller) zur Verfügung^{101,102}.

2.2.2.1 Radioaktive Synthese von CdSe/CdS/⁶⁵ZnS/ZnS Teilchen

CdSe/CdS Teilchen wurden an der TU Dresden synthetisiert. In einem 25 mL Dreihalskolben wurden 10 mL 1-Octadecen (ODE), 0,4 mmol Cd(Oleat)₂ Stammlösung, 2 g Hexadecylamin und 2 g Trioctylphosphinoxid vorgelegt. Die Lösung wurde nach dem Entgasen unter Argonstrom auf 270 °C geheizt und anschließend wurden 0,4 mmol Trioctylphosphinselenid zügig injiziert. Die Temperatur wurde nach der Injektion auf 245 °C geregelt. Nach 20 min wurde die Reaktion mit Toluol gequenchet und die CdSe Teilchen aufgearbeitet. Dann wurden 100 nmol CdSe Nanopartikel, 1,5 g Octadecylamin (ODA) und 6 mL ODE in einem 25 mL Dreihalskolben vorgelegt und entgast. Nach dem Aufheizen auf 220 °C wurden unter Argonstrom zunächst Cd(Oleat)₂ (Kationenlösung) und nach fünf Minuten S als Stocklösung in ODE (ODE:S, Anionenlösung) zugegeben. Anschließend wurde die Temperatur für 25 min gehalten. Die Bildung der zweiten Schale erfolgte analog. Die Mengen der

benötigten Präkursorlösungen für zwei Monolagen wurden auf Basis der Teilchengröße der CdSe QDs berechnet.

Für die Synthese von CdSe/CdS/⁶⁵ZnS/ZnS QDs wurden 41,2 µL 8,6 M ⁶⁵ZnCl₂-Lösung (in 0,5 M HCl, 5 µCi) in einem 25 mL Dreihalskolben vorgelegt und HCl und Wasser durch Vakuum entfernt. Dann wurden 4,0 µmol ZnCl₂ in Methanol zugegeben und schließlich eine Lösung von 30,6 µmol Stearinsäure (SA) und 17,5 µmol Tetramethylammonium Hydroxid (TMAH) in Methanol zugetropft, welches zur Fällung von ⁶⁵Zn(Stearat)₂ führte. Dieses wurde im Vakuum getrocknet und für die Beschalung der CdSe/CdS Teilchen verwendet. Dafür wurden 5 mmol CdSe/CdS Partikel, 50 mg ODA und 2 mL ODE in den Kolben gegeben und entgast. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µL 0,1 M ODE:S und die Temperatur wurde auf 220 °C geregelt und für 30 min gehalten. Daraufhin erfolgte das Herunterregeln der Temperatur auf 200 °C und die tropfenweise Zugabe von 60 µL 0,1 M Zn(Oleat)₂ und nach weiteren 5 min die Zugabe von 100 µL 0,1 M ODE:S. Die Reaktion wurde nach 60 min mit 2 mL Toluol gequench und die Teilchen wurden durch Fällung mit Isopropanol/Methanol (1:2) und Zentrifugation bei 1500 g (6 min) aufgereinigt.

2.2.2.2 Radioaktive Synthese von Mn:⁶⁵ZnSe/ZnSe Teilchen

Die Synthese erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Panda et al.¹⁰³. In einem 25 mL Dreihalskolben wurden 10 mg Mn(Stearat)₂ und 10 mL ODE vorgelegt und für 30 min bei 80 °C entgast. Die Temperatur wurde dann auf 290 °C geregelt. Währenddessen wurde in einer Glasspritze eine Lösung aus 0,5 g ODA, 0,2 mL Se Stammlösung (1,9 g Se auf 8 g Tri-*n*-butylphosphat) und 0,3 mL Tri-*n*-butylphosphat (TBP) erhitzt und diese im Folgenden in den Kolben injiziert. Die Temperatur wurde auf 260 °C heruntergeregelt und für 60 min gehalten. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und es wurden 2 mL der MnSe Teilchen für die radioaktive Synthese weiterverwendet.

Für die Herstellung von ⁶⁵Zn(Stearat)₂, welches für die ⁶⁵ZnSe Schale benötigt wurde, wurden 200 µL einer Lösung von SA und TMAH (6,8 mg SA und 4,4 mg TMAH in 200 µL Methanol) zu 1,6 mg ⁶⁵ZnCl₂ (5 µCi) getropft. Das gefällte ⁶⁵Zn(Stearat)₂ wurde im Vakuum getrocknet und mit einem Überschuss SA in 1 mL ODE aufgenommen. Die MnSe Teilchen wurden in einem 25 mL Dreihalskolben vorgelegt, entgast und auf 290 °C erhitzt. Es folgte eine schnelle Injektion der ⁶⁵Zn(Stearat)₂ Lösung und nach 2 min eine Injektion von kaltem Zn(Stearat)₂ (hergestellt aus 4,5 mg SA, 2,9 mg TMAH und 1,1 mg ZnCl₂ in 200 µL Methanol, welches ebenfalls in 1 mL ODA mit einem Überschuss SA aufgenommen wurde). Daraufhin wurde die Temperatur auf 260 °C geregelt, für

10 min gehalten und schließlich auf 180 °C geregelt. Es folgte die tropfenweise Zugabe berechneter Mengen einer Zn(Oleat)₂-Lösung und nach weiteren 5 min die Zugabe von Se als Stammlösung in TBP. Die Reaktion wurde nach 30 min auf Raumtemperatur gekühlt. Die Teilchen wurden durch Fällung mit Aceton und Zentrifugation bei 850 g (6 min) aufgearbeitet.

2.3 Überführung der Nanopartikel in wässrige Lösungen

2.3.1 Verpacken von Nanopartikeln in ein amphiphiles Polymer

Die Verpackung von sowohl SPIOs als auch QDs in das amphiphile Polymer Poly(maleinsäureanhydrid-*alt*-1-octadecen) (PMAOD) wurde nach einer von Freund abgewandelten Methode von Shtykova et al. durchgeführt^{84,85,104}.

1 mg Nanopartikel-Trockenmasse in 1 mL Chloroform wurden mit 1 mL PMAOD in Chloroform (0,01 g/mL) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch einen leichten Stickstoffstrom entfernt. Es folgte die Zugabe von 2 mL 20 % TBE-Puffer (1,3 M Tris, 450 mM Borsäure und 25 mM EDTA•Na₂ in Wasser) und das Sonifizieren der Lösung für drei mal 10 min. Danach wurde die Lösung für 10 min bei 60 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung drei mal 10 min bei 5000 rpm in der Eppifuge zentrifugiert und jeweils vorhandenes Pellet verworfen. Durch Sedimentation der verkapselten Nanopartikel in der Ultrazentrifuge werden die Teilchen aufgereinigt (1-2 h, 50000-100000 g, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und das Sediment aus Nanopartikeln in PBS (*phosphate buffered saline*, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄•7H₂O) aufgenommen. Mittels Filtern durch einen 0,22 µm Spritzenfilter (Merck Millipore, USA) wurden größere Agglomerate entfernt. Die Charakterisierung der Partikel erfolgte durch Größenausschlusschromatographie (SEC). Freie Ionen wurden durch das Filtern über einen 10 kDa Zentrifugationsfilter (Pall Corporation, USA) bei 5000 g entfernt.

2.3.2 Einbetten von SPIOs in rekombinante, triglyzeridreiche Lipoproteine (TRL)

Das Einbetten in TRLs erfolgte nach einer Vorschrift von Bruns et al.⁵⁴. Die dafür verwendeten Lipide wurden von der AG Heeren im gleichen Institut extrahiert und für die hiesigen Experimente zur Verfügung gestellt. Es wurden 10 mg Lipidextrakt in etwas Chloroform und 0,5 mg SPIOs in Chloroform (10 mg/mL) gemischt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels eines Stickstoffstroms entfernt und es wurden 1000 µL PBS zum Lipid-SPIO-Gemisch

gegeben. Das Gemisch wurde für 3x 3 min 20 s sonifiziert und direkt im Anschluss durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (Merck Millipore, USA) gefiltert. Freie Ionen wurden chromatographisch über eine PD-10 Säule (GE Healthcare, Großbritannien) abgetrennt.

2.4 Austauschradiomarkierung von Nanopartikeln und Iodierung von Proteinen

2.4.1 Radiomarkierung der Nanokristalle

Für die Radiomarkierung von SPIOs wurden Aliquots von $^{51}\text{CrCl}_3$ bzw. $^{59}\text{FeCl}_3$ in 0,5 M HCl (20-50 µCi, Perkin-Elmer, USA) lyophilisiert. Anschließend wurden zwischen 2-5 mg (Trockenmasse) ölsäurestabilisierte SPIOs in Chloroform (500 µL) zu den *Radiotracer*n gegeben und die Lösung für mindestens 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

Für die Radiomarkierung von QDs wurden Aliquots von $^{65}\text{ZnCl}_2$ in 0,5 M HCl (20-30 µCi, Perkin Elmer, USA) lyophilisiert, bevor die QDs in Chloroform zugegeben wurden.

2.4.2 Iodierung von Transferrin

Aliquots einer kommerziell erhältlichen Na^{125}I Lösung in 0,1 M NaOH (20-50 µCi, PerkinElmer, USA) wurden zu einer Lösung aus 2 mg murinem Transferrin (Rockland Immunochemicals Inc., USA) in 1 mL SBB Puffer (50 mM H_3BO_3 , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ in Wasser, pH 9,0) und unter Zugabe einer Pierce® Iodination Bead (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Ionen wurden mit Hilfe einer PD-10 Säule (GE Healthcare, Großbritannien) abgetrennt.

2.5 Untersuchungen zur Radiomarkierung der Nanokristalle

2.5.1 ^{51}Cr -markierte SPIOs

2.5.1.1 Stabilität des ^{51}Cr -Labels unter sauren Bedingungen

Verpackte ^{51}Cr -SPIOs wurden mit Salzsäure versetzt (Endkonzentration 0,1 M, Gesamtvolumen 500 µL, zwei Ansätze) und zum einen bei Raumtemperatur, zum anderen bei 37 °C geschüttelt. Bei 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden je 50 µL Aliquots entnommen und diese mittels 5 kDa Zentrifugationsfilter in der Eppifuge gefiltert (15 min, 10000 rpm). Im Filter

zurückgehaltenes Material und durch den Filter gelaufenes Filtrat wurden getrennt aufgenommen und die Radioaktivität im Hamburger Ganzkörperzähler (HAMCO) und die Eisenkonzentration mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) gemessen.

2.5.2 ⁶⁵Zn-markierte Kern/Schale/Schale QDs

2.5.2.1 Überprüfung des Einbaus von ⁶⁵Zn in ölsäurestabilisierte QDs

Radioaktive Synthese

Ein Aliquot der synthetisierten QDs in Chloroform wurde mit Isopropanol/Methanol (im Verhältnis 1:2) gefällt. Zur Verfestigung des Pellets wurde die Suspension für 8 min bei 14000 rpm in der Eppifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und der Feststoff erneut in Chloroform gelöst. Fällung und Resuspension wurden noch zwei Mal auf die gleiche Art durchgeführt. Die Radioaktivität in den Überständen und in den final resuspendierten Teilchen wurde im HAMCO gemessen.

Austauschradiomarkierung

Es wurden 2 h, 4 h und 24 h nach Ansetzen der QDs mit ⁶⁵ZnCl₂ in Chloroform (Gesamtvolumen 1000 µL) je 100 µL Aliquots entnommen und mit 500 µL Methanol versetzt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 14000 rpm in der Eppifuge zentrifugiert. Die Radioaktivität gefällter QDs und der Überstände wurde im HAMCO gemessen.

2.5.2.2 Stabilität des ⁶⁵Zn-Labels unter pH-neutralen Bedingungen

Filterversuche

Ein Aliquot radiomarkierter, verpackter QDs in 400 µL PBS wurde bei 5000 g über einen 10 kDa Zentrifugenfilter gefiltert. Nach dem Abtrennen des gesamten PBS wurden die Partikel in 400 µL PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde nach 6 h und nach weiteren 18 h wiederholt. Die durch radioaktive Synthese gewonnenen QDs erfuhren eine Weiterbehandlung in der Form, dass sie zusätzlich nach der dritten Resuspension auf ein Gesamtvolumen von 1000 µL gebracht und für 3x 5 min geschallt wurden. Danach folgte eine letzte Trennung der QDs vom Lösungsmittel durch Filtration. Die Radioaktivität der resuspendierten QDs und der Überstände wurde im HAMCO bestimmt.

Dialyse

Ein Aliquot der, durch ⁶⁵Zn-Austausch radiomarkierten und verpackten, QDs wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 500 µL gebracht und in einen

Dialyseschlauch (Porendurchmesser $\sim 25 \text{ \AA}$, Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland) überführt. Die Dialyse erfolgte in 1 L PBS, wobei durch einen Magnetrührer eine ständige Umwälzung des Puffers gewährleistet wurde. Die Radioaktivität in Dialyseschlauch und -puffer wurde nach 24 h gemessen und der Dialyseschlauch anschließend in neues PBS überführt. Die Prozedur wurde drei Mal wiederholt.

2.6 Kopplung von Transferrin an SPIOs und QDs

Die Bindung von Transferrin an die Hülle polymerverpackter SPIOs wurde nach einer von Freund abgewandelten Methode von Sperling et al. durchgeführt^{84,105}.

Die verpackten Teilchen wurden mittels eines 10 kDa Zentrifugationsfilters eingengt und anschließend auf eine Konzentration von $6 \mu\text{M}$ in SBB Puffer gebracht. Zu einem ausgewählten Volumen $6 \mu\text{M}$ SPIOs wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) derselben Menge (6 mM in SBB) gegeben. Für den Fall, dass keine kovalente Bindung zwischen Hülle und Transferrin erzeugt werden sollte, wurde das EDC weggelassen und nur SBB Puffer zugefügt. Anschließend wurde dasselbe Volumen von $600 \mu\text{M}$ Transferrin zugegeben und der Ansatz für 2 h bei Raumtemperatur und im Weiteren über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Labor-Rollenmischer inkubiert. Der Überschuss an freiem Transferrin wurde mit einem 100 kDa Zentrifugationsfilter (Merck Millipore, USA) durch mehrfache Zentrifugation bei $3500 g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und wiederholte Resuspension in PBS abgetrennt.

Auf die gleiche Art wurde Transferrin, sowie auch Asialofetuin, an QDs gekoppelt.

In einigen Fällen wurde das Protein vor der Kopplung mit einem Cy5-*Monoreactive Dye* Kit (GE Healthcare, USA) fluoreszenzmarkiert. Dazu wurde eine Lösung von murinem Transferrin (1 mg in 1 mL) in einem $0,1 \text{ M}$ Carbonatpuffer zum Kit gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch das Reaktionsgefäß invertiert. Ungebundene Fluoreszenzmoleküle wurden über eine PD-10 Säule abgetrennt und im gleichen Zuge das Protein in SBB Puffer aufgenommen. Das humane Transferrin lag schon fluoreszenzmarkiert (Alexa 546) vor (Invitrogen, USA).

2.7 Bioanalytik

2.7.1 Bestimmung der Eisenkonzentration

Für die Eisenbestimmung wurde zum einen ein Atomabsorptionsspektrometer (Perkin-Elmer 4100) mit Graphitrohr verwendet. Die Proben wurden zuvor in der Art aufbereitet, dass evtl. noch intakte Partikel aufgelöst wurden. Dazu wurden die Proben mit HCl versetzt, so dass diese eine Endkonzentration von 1 M HCl betragen. Die Proben wurden für 30 min bei 70 °C geschüttelt und konnten anschließend vermessen werden.

Alternativ wurde die Eisenkonzentration auch photometrisch bestimmt. Dafür wurden 50 µL 5 M HCl zu 200 µL Probe gegeben und für 30 min bei 70 °C geschüttelt. Aus diesem Ansatz wurden 50 µL entnommen und 150 µL 2 M Acetatpuffer (mit 10 % (w/V) Ascorbinsäure, pH 4,8) sowie 100 µL Bathophenantrolinlösung (1 mg/mL) zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Absorption bei 540 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (Amersham Biosciences, UK) gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von FeCl₃ (0 - 51,2 µg/mL).

2.7.2 Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie (SEC, *size-exclusion chromatography*) wurde eine Superose-6 10/300 GL Säule (GE Healthcare, USA) mit Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min verwendet. Die Fraktionen wurden im Abstand von 1 min gesammelt.

2.7.3 Agarosegelelektrophorese

Nanopartikel wurden in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur in 1 % (w/V) Agarosegelen bei 80-100 V nach Größe und Ladung aufgetrennt. Gegebenenfalls wurden Proteine mittels Coomassie zur Detektion angefärbt. Dafür wurden die Gele nach Auftrennung der Partikel für 30 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung (45 % Ethanol (V/V), 10 % Essigsäure (V/V), 45 % Wasser (V/V), 0,252 % (w/V) Coomassie Brilliant Blau R-250) gelegt. Zum Abtrennen nicht-proteingebundenen Farbstoffs wurde das Gel anschließend über Nacht in Entfärberlösung (25 % Ethanol (V/V), 10 % Essigsäure (V/V), 65 % Wasser (V/V)) gelegt.

2.7.4 Messung der Radioaktivität

Cr-51, Zn-65 und Fe-59 wurden im Hamburger Ganzkörperzähler (HAMCO) gemessen (Abbildung 2.1). Der Radioaktivitätsdetektor besteht aus vier hintereinander angeordneten Detektorringen. Jeder Ring enthält zwei halbkreisförmige Tanks mit flüssigem, organischen Szintillator, so dass eine quasi 4π Messgeometrie erreicht wird¹⁰⁶. Dahinterliegende Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*) amplifizieren das von den Szintillatoren, aus der eingegangenen ionisierenden Strahlung, in Licht umgewandelte Signal. Der daraus erzeugte Stromimpuls, dessen Frequenz messbar ist lässt eine Messung der Radioaktivität zu. Der Vorteil des Geräts ist, dass damit auch größere Proben oder, wie sich auch aus dem Namen ableiten lässt, ganze Körper vermessen werden können.

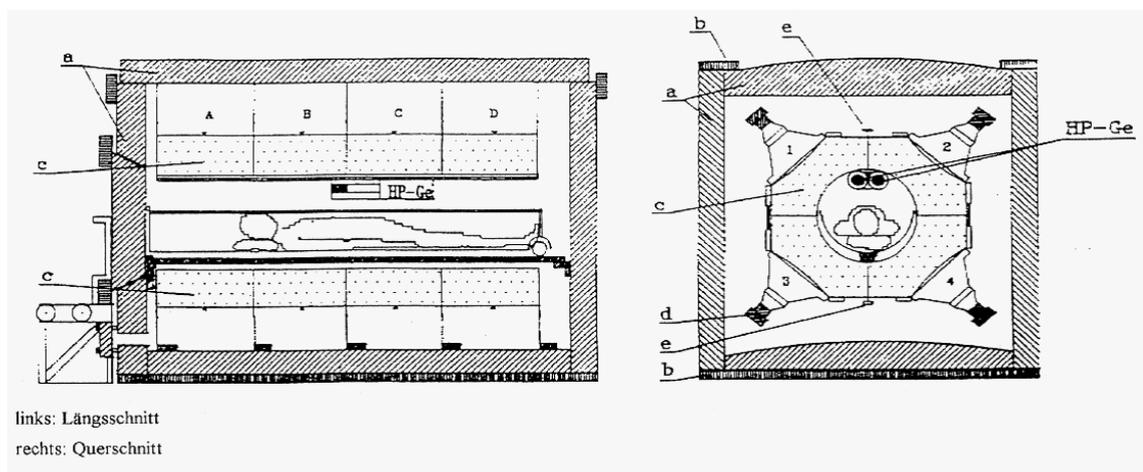


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Ganzkörperzählers. Der HAMCO besitzt vier hintereinander angeordnete Ringe A, B, C, D. Die Ringe sind in $(2 \times 2\pi)$ Modultanks aufgeteilt (die gepunkteten Flächen stellen den flüssigen Szintillator dar). An jeden Tank liegen zwei Du Mont-K 1328 *Photomultiplier* (1, 2, 3, 4) an. a: 15 cm Stahlplatten (Voratomzeitalter-Stahl), b: 5 cm Halterahmen (Voratomzeitalter-Stahl), c: Szintillatorflüssigkeit in Modultanks, d: Vorverstärker auf *Photomultiplier*-Basis, e: Lichtquellen, HP-Ge: zwei GP-Ge-Detektoren (aktuell nicht mehr vorhanden). Adaptiert aus¹⁰⁶.

I-125 wurde an einem 2470 WIZARD² Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, USA) gemessen.

2.7.5 Photometrische Untersuchung

Absorptionsspektren von QDs wurden an einem UV/Vis Spektralphotometer (NanoDrop, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland) aufgenommen.

2.7.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. wurde zunächst Lösung C aus Lösung A (2% Na₂CO₃ und 0,02 % NaK-Tartrat in 0,1 M NaOH) und Lösung B (0,5 % CuSO₄ und 5 % SDS in Wasser) im Verhältnis 50:1 frisch angesetzt¹⁰⁷. Dann wurden 10 µL Probe, 40 µL 0,1 M NaOH und 500 µL Lösung C gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 50 µL Folin-Ciocalteau-Phenolreagenz (mit Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt). Die gut gemischte Lösung wurde für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 760 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer gemessen. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (0 - 2 mg/mL).

2.8 Zellkultur

2.8.1 J774-Zelllinie

Die murine Makrophagen Zelllinie J774 wurde in DMEM (4,5 g/L Glukose, mit L-Glutamin, ohne Pyruvat) mit 25 mM HEPES, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Passagierung erfolgte im Abstand von 2 bis 3 Tagen durch Abschaben und Aussaat in neue Zellkulturflaschen.

2.8.2 αML-12-Zelllinie

Die murine Hepatozyten Zelllinie αML-12 wurde in DMEM-GlutaMAX™ (4,5 g/L Glukose, mit Pyruvat) mit 25 mM HEPES, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Passagierung erfolgte im Abstand von 2 bis 4 Tagen durch Trypsinierung und Aussaat in neue Zellkulturflaschen.

2.8.3 Nanopartikel-Aufnahme *in vitro*

Experimente zur Nanopartikel-Aufnahme wurden mit *6-Well*- oder *24-Well*-Zellkulturplatten (Nunc GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die Aussaat erfolgte in der Regel zwei Tage vor dem Experiment. J774-Zellen wurden mit einer Zelldichte von ca. $4 \cdot 10^5$ Zellen/ *Well* in *6-Well* Platten und mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/ *Well* in *24-Well* Platten mit Coverslips (13 mm ø, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Deutschland) ausgesät. αML-12-Zellen wurde mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ *Well* in *24-Well* Platten mit Coverslips ausgesät. Die Zellen wurden mit Nanopartikeln in einer Konzentration von 1 µM in Zellkulturmedium in angegebener Dauer bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zellen, welche mit SPIOs inkubiert wurden, wurden zur Bestimmung der Eisen- und Proteinkonzentration geerntet. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit zunächst kaltem Medium und anschließend für 5 min mit HBSS-Puffer, welchem 50 μM des Chelators DTPA zugesetzt war, gewaschen. Die Zellen wurden in HBSS abgeschabt und für 5 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Für eine Eisenbestimmung mittels AAS wurden die Zellen in Matrixlösung (0,02 mol/L HNO_3 , 1 % Triton X-100) aufgenommen und mit 5 M HCl versetzt (Endkonzentration HCl: 1 M). Die Proben wurden für 30 min bei 70 °C geschüttelt und konnten anschließend vermessen werden. Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen in Zellysepuffer (50 mmol/L Tris, 2 mmol/L CaCl_2 , 80 mmol/L NaCl, 1 % Triton X-100) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente wurden in 20 min bei 10000 g und 4 °C pelletiert und der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt.

Zellen, welche mit QDs inkubiert wurden, wurden nach drei Waschgängen mit einmal Medium und zweimal PBS für immunzytochemische Färbungen fixiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach Entfernen der Nanopartikel zunächst weiter kultiviert und erst später fixiert.

2.8.4 Isolation von primären, murinen Hepatozyten

Primäre, murine Hepatozyten wurden aus Lebern von 8-12 Wochen alten Mäusen isoliert, indem die Leber über die Pfortader mit ca. 400 mL einer auf 37 °C vorgewärmten EDTA-Lösung (0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl_2 , 1,6 mM Na_2HPO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 , 2,1 g/L NaHCO_3 , 0,745 g/L EDTA, 2,97 g/L Glucose, 0,846 g/L Lactat, 0,022 g/L Pyruvat, sterilfiltriert, pH 7,4) mit einer Flussgeschwindigkeit von 5-8 mL/min perfundiert wurde. Die Leber wurde anschließend in eine Petrischale mit etwas Medium gelegt und die Kapsel geöffnet, so dass die Zellen durch sanftes Schütteln an dem Kapselsack aus der Leber traten. Die gesamten Zellen wurden in 25 mL 37 °C warmem DMEM (4,5 g/L Glucose, mit L-Glutamin, ohne Pyruvat, mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) aufgenommen und über ein Sieb (BD Biosciences, USA) mit einer Porengröße von 70 μm gefiltert. Die Zellen wurden bei 28 g für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (langsame Beschleunigung und Bremsung) und der Überstand mit nicht-parenchymalen Zellen entfernt. Das Pellet wurde in etwa 8 mL DMEM aufgenommen und es wurden 13,9 mL Percoll und 2.1 mL 10x-Perfusionspuffer (1.4 M NaCl, 50 mM KCl, 8 mM MgCl_2 , 16 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KH_2PO_4) zugegeben und die Zellsuspension wurde invertiert. Die Dichtegradientenzentrifugation bei 855 g für 6 min (ohne Bremse) trennt vor allem nicht-vitale Hepatozyten von den vitalen Zellen (Pellet). Die vitalen Hepatozyten wurden in 10 mL DMEM aufgenommen und gezählt.

Für die Bestimmung des Radioaktivitätsgehaltes wurden alle anfallenden Fraktionen im HAMCO gemessen.

2.8.5 Isolation von primären nicht-parenchymalen Leberzellen

Für die Isolation nicht-parenchymaler Leberzellen wurden Mauslebern durch die Pfortader mit 5 mL einer auf 37 °C angewärmten Collagenase-Lösung (0,05 % Collagenase NB4G, Serva, in GBSS) perfundiert. Die entnommenen Lebern wurden in einer Petrischale mit Schere und Pinzette zerkleinert und dann mit 2 mL Collagenase-Lösung pro Leber im Schüttelwasserbad für 30 min bei 37 °C verdaut. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Sieb (100 µm) gestrichen, mit PBS auf etwa 50 mL aufgefüllt und bei 40 g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand mit nicht-parenchymalen Zellen wurde nochmals mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert, um verbliebene parenchymale Zellen abzutrennen. Daraufhin wurde der Überstand für 10 min bei 430 g zentrifugiert, um die nicht-parenchymalen Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 5 mL PBS aufgenommen und mit 2 mL Optiprep (Progen Biotechnik GmbH, Deutschland) versetzt und mit 1 mL PBS überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte für 25 min bei 400 g (ohne Bremse). Die in der Interphase angereicherten nicht-parenchymalen Zellen wurden mit 2 mL Erythrozyten-Lysepuffer versetzt (154 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA) und für 3 min inkubiert, um vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Darauf wurde der Ansatz mit PBS auf ca. 10 mL aufgefüllt und die nicht-parenchymalen Zellen in 4 min bei 430 g pelletiert und in 0,5 mL MACS-Puffer (0,5 % EDTA, 0,5 % bovines Serumalbumin Fraktion V, in PBS) resuspendiert.

Nicht-parenchymale Zellen, von Mäusen, denen zuvor polymerverpackte SPIOs injiziert wurden, wurden nun über eine Säule im Magnetfeld (Miltenyi Biotech, Deutschland) gegeben. Die so isolierten Zellen wurden in einer Dichte von ca. $5 \cdot 10^5$ / Well einer 24-Well Platte auf Coverslips ausgesetzt und über Nacht in RPMI 1640 (10 % FCS, 2 % Antibiotic-Antimycotic) kultiviert und konnten am nächsten Tag für immunzytochemische Färbungen fixiert werden.

Die spezifische Isolation von Kupfer-Zellen und Endothelzellen von Mäusen, die zuvor keine intravenöse Gabe von polymerverpackten SPIOs erhielten, wurde mit Hilfe von magnetischen *Beads* durchgeführt. Um Kupfer-Zellen mit den magnetischen *Beads* zu versehen wurden die Zellen zunächst mit APC-gekoppeltem F4/80-Antikörper (eBioscience, USA; 1 µL/10⁷ Zellen, 15 min, 4 °C) und darauffolgend für 15 min (4 °C) mit anti-APC *magnetic beads* (Miltenyi Biotech, Deutschland, 10 µL/10⁷ Zellen) inkubiert. Daraufhin konnten die Zellen über die Säule im Magnetfeld als F4/80-positive Fraktion isoliert

werden. Sinusoidale Endothelzellen wurden durch Inkubation mit anti-CD146 *magnetic beads* (Miltenyi Biotech, Deutschland) isoliert.

Sowohl Zellen von mit SPIOs behandelten Mäusen als auch Zellen unbehandelter Mäuse wurden in einem weiteren Experiment via Durchflusszytometrie (BD FACSCalibur™, BD Biosciences, USA) untersucht. Die Zellen wurden dafür nach der Isolation in FACS-Puffer (1 % bovines Serumalbumin Fraktion V, 0,1 % NaN₃, in PBS) aufgenommen. Die Färbung von Kupffer-Zellen erfolgte mit anti-F4/80 (APC-gekoppelt) und die Färbung von sinusoidalen Endothelzellen mit anti-VE-Cadherin (ebenfalls APC-gekoppelt) für 1 h bei 4 °C mit je 0,5 µg/mL Antikörper auf ca. 1*10⁶ Zellen in 200 µL.

2.8.6 Immunzytochemische Färbungen

Die Zellen wurden mit 4 % PFA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und die fixierten Zellen wurden 3x 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte das Blocken unspezifischer Bindungen mit 1 % BSA in PGS (0,5 % Glycin, 0,05 % Saponin in PBS) für 15 - 60 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden wiederholt 3x 5 min mit PGS gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit primärem Antikörper in PGS für 1 h bei 37 °C. Nach drei 5-minütigen Waschgängen mit PGS wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden schließlich ein letztes mal 4x 1 min mit PBS gewaschen und für mikroskopische Aufnahmen auf Objektträger gebracht.

Folgende Antikörper mit entsprechenden Verdünnungen wurden eingesetzt.

Primäre Antikörper: rat anti-CD31 (1:50, Abcam), mouse anti-lamp1 (1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank) und rabbit anti-CD68 (1:100, Abcam).

Sekundäre Antikörper: Cy5 anti-rat (1:200, Jackson Immuno Research Laboratories), Alexa 488 anti-mouse (1:250, Jackson Immuno Research Laboratories) and Alexa 488 anti-rabbit (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories).

Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Mikroskopische Aufnahmen wurden an einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (Nikon A1R) vorgenommen.

2.9 *In vivo*- Untersuchungen

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg durchgeführt (Tierversuchsnummer 34/10). Für die Experimente wurden männliche Wildtyp-Mäuse der Linien BALB/C oder

FVB verwendet, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren und unter einem 12 h-Tag/ Nacht-Zyklus gehalten wurden.

Wenn in TRL eingebettete SPIOs injiziert wurden, wurden die Versuchstiere für 3 h vor der Injektion gefastet.

2.9.1 Bluthalbwertszeit und Organverteilung

Die Injektion von 200 μL der Nanopartikel-haltigen Lösungen erfolgte in die Schwanzvene. Um die Bluthalbwertszeit zu bestimmen wurden in verschiedenen Zeitabständen ca. 50 μL Blut retrobulbär entnommen und die spezifische Aktivität der Blutproben bestimmt. Durch Berechnung des Gesamtblutvolumens des Versuchstieres ($\sim 74 \text{ mL/kg}$ Körpergewicht¹⁰⁸), kann die zu einem bestimmten Zeitpunkt zirkulierende Menge an Aktivität abgeschätzt werden.

Die Versuchstiere wurden nach angegebener Zeit durch eine Überdosis Ketamin/ Rompun getötet. Die Organe wurden mit PBS/ Heparin (ROTEXMEDICA GmbH, Deutschland, 50 U/mL) oder, falls histologische Untersuchungen durchgeführt werden sollten, mit 4 % PFA und 5 % Sucrose in PBS perfundiert und anschließend entnommen.

2.9.2 Herstellung von Kryoschnitten und immunhistochemische Färbungen

Um Kryoschnitte anzufertigen wurden die Lebern nach Entnahme in 4 % PFA und 5 % Sucrose in PBS für 60 min auf Eis gelegt. Gefrorene Gewebestücke wurden, in O.C.T (Sakura Finetek Europe, Niederlande) eingebettet, in 10 μm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger (Superfrost/ Plus, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Deutschland) gebracht. Die Gewebsschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Färbung wurden die Schnitte mit 1 % BSA in PGS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blocken wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei 1-minütige Waschgänge mit PGS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Nach weiteren drei Waschungen mit PBS wurden die Gewebsschnitte auf den Objektträgern für mikroskopische Aufnahmen am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop durch Aufkleben von Glasplättchen geschützt.

Folgende Antikörper mit entsprechenden Verdünnungen wurden eingesetzt.

Primäre Antikörper: rat anti-CD31 (1:50, Abcam) und rabbit anti-CD68 (1:100, Abcam).

Sekundäre Antikörper: Alexa 647 anti-rabbit (1:100, Jackson Immuno Research Laboratories) and Cy3 anti-rat (1:50; Jackson Immuno Research Laboratories).

2.10 Statistik

Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Test* überprüft. Bei $P < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen. Graphen und Fits wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 erstellt. Die Berechnungen der Kompartiment-Modelle erfolgte mit dem Programm SlideWrite Plus 7.0.

3 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten von Nanopartikeln mit verschiedenen Radionukliden markiert um die Frage nach der Verteilung und dem Verbleib der Partikel zu beantworten. Darüber hinaus wurde mit Hilfe dieser Radiomarkierung untersucht, wie sich eine Modifizierung der Oberfläche von Nanopartikeln mit Proteinen auf die Aufnahme und die daraus resultierende Verteilung auswirkt. Die Arbeit untergliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Teil wird die Radiomarkierung und die folgende *in vivo* Charakterisierung der Nanopartikel vorgestellt. Im zweiten Teil wird näher auf die Zellverteilung eingegangen und der dritte Teil beschäftigt sich mit der Oberflächenmodifizierung und der Frage inwieweit eine Funktionalisierung mit Proteinen möglich ist.

3.1 Radiomarkierung und partikokinetische Untersuchungen von Nanopartikeln

Im Folgenden wird die postsynthetische Radiomarkierung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIOs) und von Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots, QDs) mit unterschiedlichen Radionukliden und darauf folgenden partikokinetischen Untersuchungen beschrieben. Die Radiomarkierung ist eine in der Biochemie häufig angewandte Methode um Reaktionswege von Molekülen, oder allgemein Reaktanten, zu verfolgen.

3.1.1 Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr

In einer vorangegangenen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe wurde vor kurzem eine postsynthetische Radiomarkierung von monodispersen SPIOs mit ^{59}Fe ($t_{1/2}=44,5$ d, γ -Strahlung, 1,1 MeV) entwickelt, mit deren Hilfe eine ausführliche *in vivo* Charakterisierung der Teilchen mit unterschiedlichen Hüllen möglich war^{84,85}. In der vorliegenden Arbeit wurden die gleichen monodispersen Eisenoxidpartikel verwendet. Die Oberfläche der Partikel ist ölsäurestabilisiert, welches die Partikel vor Aggregation schützt (Abbildung 3.1). Aus der Vorarbeit war gut bekannt, dass es bei der Inkubation mit wasserfreiem $^{59}\text{FeCl}_3$ zu einem stabilen und homogenen Einbau des radioaktiven Isotops kommt. Dasselbe passiert offenbar, wenn ölsäurestabilisierte SPIOs mit wasserfreiem $^{51}\text{CrCl}_3$ inkubiert werden. Das radioaktive Nuklid $^{51}\text{Cr}^{3+}$ ($t_{1/2}=27,7$ d, γ -Strahlung, 0,32 MeV) wird stabil in die Partikel eingebaut (Abbildung 3.1). Eine mögliche Erklärung dafür, dass ein verbindungs-fremdes Atom in den Fe-Nanokristall

eingebaut wird, bietet die Tatsache, dass beide Elemente zur Gruppe der Übergangsmetalle gehören und mit gleicher Ladung fast gleiche Ionenradien haben (Cr^{3+} , 0,62 Å; Fe^{3+} , 0,65 Å)¹⁰⁹. Außerdem bilden sie sehr ähnliche Oxide und haben die Eigenschaft Spinelle zu bilden. Selbst die Verbindung Fe_3O_4 , oder präziser $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$, die auch als Magnetit bezeichnet wird, gehört zu den Spinellen und hat eine starke Ähnlichkeit mit Chromit. Chromit, FeCr_3O_4 , ist die am häufigsten natürlich vorkommende Verbindung von Chrom und ebenfalls ein Vertreter der Spinelle und besitzt damit eine gleichartige Spinellstruktur. Es ist daher möglich, dass die ^{51}Cr -Austauschmarkierung ähnlich funktioniert wie die mit ^{59}Fe , nur dass ein Chrom-Ion statt eines Eisen-Ions eingebaut wird.

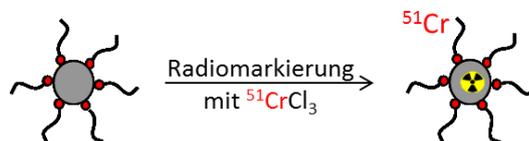


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr . ^{51}Cr wird in den Eisenoxid-Nanokristall eingebaut.

Der Einbau von ^{51}Cr findet in einem aprotischen Lösungsmittel, hier Chloroform, statt. Für Untersuchungen in biologischen Systemen ist es notwendig die Oberfläche zu modifizieren, so dass die Partikel in wässrigen Systemen nicht ausfallen. Eine Möglichkeit und die hier angewandte Methode ist die Verpackung in ein amphiphiles Polymer. Dieses Verfahren wurde erstmals 2004 von Pellegrino et al. beschrieben, ist seitdem eine häufig angewandte Methode zur Verkapselung von lipophilen Nanokristallen und bedient sich der Substanz Poly(maleinsäureanhydrid-*alt*-1-octadecen) (PMAOD)^{104,110-112}. Abbildung 3.2. zeigt schematisiert wie man sich die Verkapselung in das Polymer vorstellt. Die stabilisierenden langkettigen Moleküle, wie z.B. Ölsäure, zeigen vom wasserunlöslichen Partikel weg, wie die Borsten auf einer Bürste. Vermutlich interkalieren die hydrophoben Alkylketten des Polymers mit den Oberflächenketten der Nanopartikel. Beim Überführen in ein wässriges Lösungsmittel öffnen sich die nach außen gelagerten Anhydrid-Ringe und bilden Carbonsäuren, die den Nanopartikel ‚wasserlöslich‘ machen¹¹³.

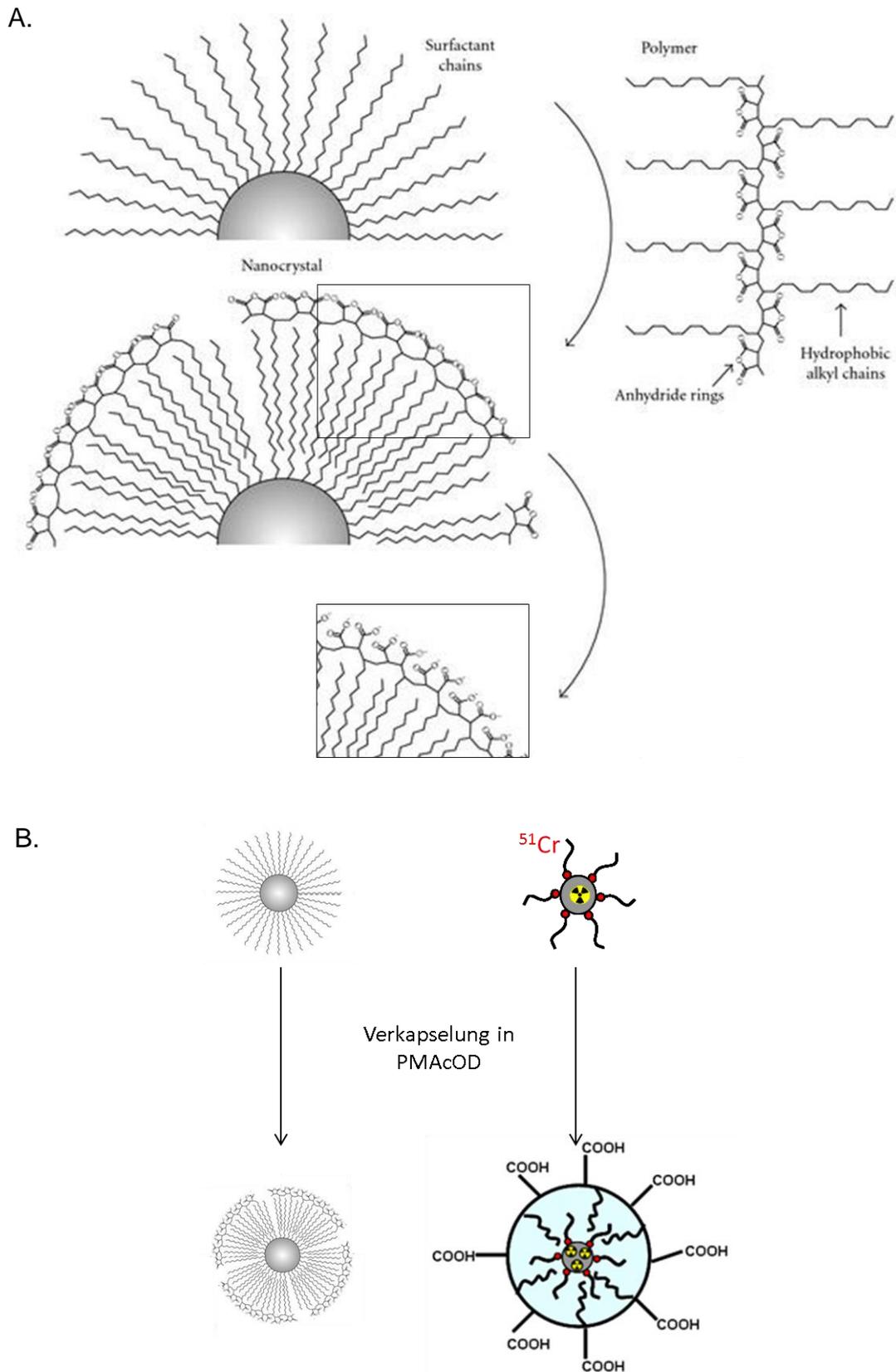


Abbildung 3.2: Verpackung von Nanokristallen in PMAOD. A.) Die Alkylketten des Polymers interkalieren mit den stabilisierenden Ölsäureketten des Partikels. B.) Stilisierte Darstellung der Verpackung mit PMAOD. Modifiziert nach ¹¹⁰.

Eine weitere Methode der Oberflächenmodifizierung zwecks Anwendung in biologischen Systemen wird in einem späteren Kapitel vorgestellt.

Um zu prüfen, ob die radiomarkierten und verpackten SPIOs das *Label* stabil und homogen eingebaut haben, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Als erstes wurden die Partikel mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, *size-exclusion chromatography*) analysiert (Abbildung 3.3). Die UV-Absorption bei 280 nm zeigt einen schmalen Peak bei etwa 24 min, welcher die SPIOs repräsentiert. Das Eluat wurde fraktioniert und die Radioaktivität in den jeweiligen Fraktionen gemessen. Trägt man die gemessene Aktivität ebenfalls gegen die Zeit auf, zeigt sich, dass die SPIOs und die Aktivität zeitgleich eluieren. Dies ist ein Zeichen dafür, dass das ^{51}Cr -Label in die SPIOs eingebaut ist.

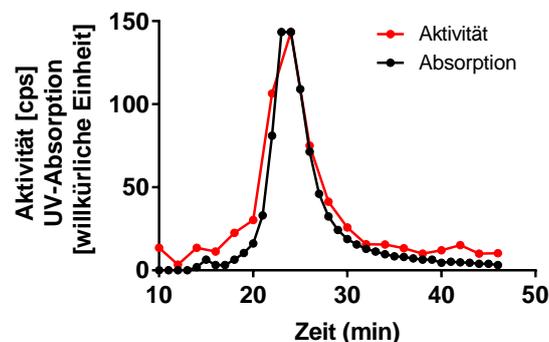


Abbildung 3.3: SEC von, mit ^{51}Cr -markierten, SPIOs. Nanopartikel und *Label* eluieren zeitgleich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ^{51}Cr stabil in den Kern eingebaut wurde.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob sich die Markierung homogen im Kern oder lediglich im äußeren Bereich des sphärischen Nanopartikels verteilt hat. Die SPIOs wurden mit Salzsäure mit einer Endkonzentration von 0,1 M versetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, um in diesen sowohl den Gehalt an freigesetzten Eisen-Ionen der degradierten SPIOs als auch die freigesetzte Aktivität von ^{51}Cr zu bestimmen. Dafür wurden Zentrifugationsfilter (10 kDa) verwendet, welche freie Ionen durchlassen, intakte SPIOs jedoch im Filter zurückhalten. Der Versuch wurde zum einen bei Raumtemperatur, zum anderen bei 37 °C, welches der Beanspruchung in biologischen Systemen näher kommt, durchgeführt. Das Filterexperiment zeigt eine gleichmäßige Freisetzung des radioaktiven Labels. Bei 22 °C sind nach 96 h Inkubation weniger als 25 % des Labels freigesetzt (Abbildung 3.4 A.). Die Filtrate wurden zusätzlich nach ihrem Eisengehalt untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Eisen-Ionen etwa in gleichem Maß freigesetzt werden wie ^{51}Cr -Ionen, welches für eine homogene Verteilung

der ^{51}Cr -Markierung im Kern spricht (Abbildung 3.4 B.). Bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ ist die Freisetzung des radioaktiven *Labels* stark beschleunigt und schon nach 48 h mit 100% beendet (Abbildung 3.4 C.). Der prozentual niedrigere Eisengehalt in den Filtraten weist darauf hin, dass die Degradation der Partikel zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen ist (Abbildung 3.4 D.). Bei *in vitro*- bzw. *in vivo*-Versuchen sollte daher berücksichtigt werden, dass die Freisetzung des *Labels* und die vollständige Degradation etwas zeitversetzt geschehen, insgesamt beide Prozesse aber relativ rasch ablaufen.

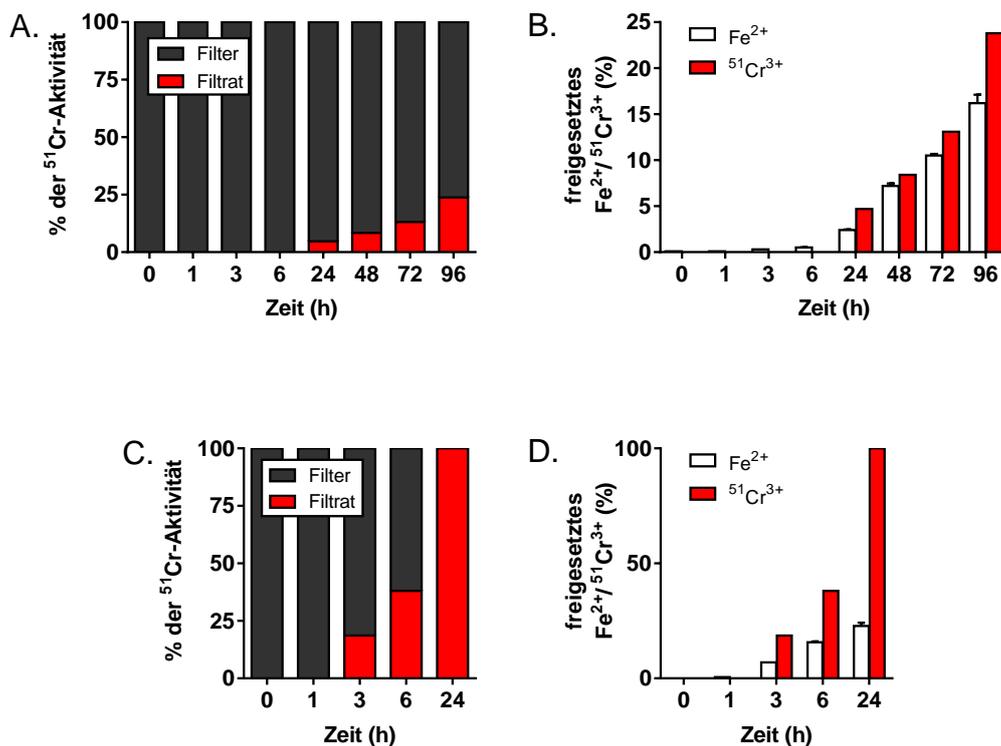


Abbildung 3.4: Untersuchung der Stabilität von ^{51}Cr -markierten SPIOs bei Inkubation mit Salzsäure (Endkonzentration $0,1\text{ M}$). A.) Zeitabhängige Freisetzung von ^{51}Cr bei $22\text{ }^\circ\text{C}$. B.) Vergleich mit der gleichzeitigen Freisetzung von Fe^{2+} aus SPIOs. C.) Zeitabhängige Freisetzung von ^{51}Cr bei $37\text{ }^\circ\text{C}$. D.) Vergleich mit der gleichzeitigen Freisetzung von Fe^{2+} aus SPIOs bei $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Abschließend ist festzuhalten, dass eine Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr erfolgreich war. Die Größenausschlusschromatographie als auch die Filtrationsexperimente zeigen, dass das *Label* stabil ist und homogen im Kern verteilt zu sein scheint. An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass die analoge Inkubation mit wasserfreien $^{65}\text{Zn}^{2+}$ zu keinem Einbau der Aktivität in den Eisenoxid Kern von SPIOs geführt hat, was durch die große Verschiedenheit von Fe^{3+} und Zn^{2+} leicht erklärt werden kann.

3.1.2 Partikokinetische Untersuchungen von ^{51}Cr -SPIOs

Für partikokinetische Untersuchungen wurden Mäusen die Nanopartikel intravenös injiziert. Diese Art der Applikation ist in der Nanomedizin neben der oralen Gabe die Bedeutsamste.

Um zu untersuchen, wie die Partikel im lebenden Organismus verteilt werden, wurden den Versuchsmäusen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Gabe die Organe entnommen und deren Aktivität gemessen. In diesem Versuch wurde die Organverteilung nach 2 Stunden (2 h, Abbildung 3.5). und 4 Wochen (4 w, Abbildung 3.6) bestimmt. Bei der Gabe von ^{51}Cr -markierten SPIOs wurde die Eisenmenge als Maß genommen. Jede Maus erhielt zwischen 50 und 100 μg Eisen. Als Kontrolle wurde einer weiteren Gruppe dieselbe Aktivität in Form von $^{51}\text{CrCl}_3$ in die Schwanzvene injiziert.

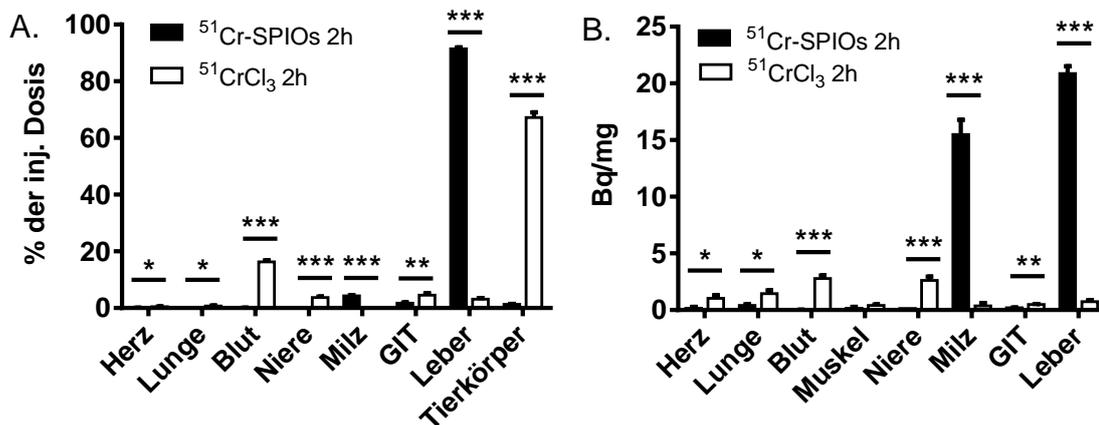


Abbildung 3.5: Organverteilung von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ nach 2 h. A.) Prozentuale Organverteilung und B.) spezifische Aktivität von Organen 2 h nach Injektion von ^{51}Cr -markierten SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ in die Schwanzvene. GIT = Gastrointestinaltrakt, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wie in der prozentualen Organverteilung nach 2 h zu erkennen ist, werden etwa 90 % der SPIOs von der Leber aufgenommen. Berücksichtigt man die Masse der verschiedenen Organe wird klar, dass die Milz ebenfalls ein wichtiges Aufnahmeorgan für SPIOs darstellt. Die Organverteilung von ionischem Chrom dagegen unterscheidet sich stark von derjenigen von SPIOs. Etwa ein Sechstel der injizierten Dosis zirkuliert nach 2 h noch im Blut. Ionisches Chrom wird scheinbar kaum von den Organen aufgenommen. Vielmehr scheint es sich im Endothel der Blutgefäße abzulagern. Diese Annahme begründet sich in der Beobachtung, dass nach 2 h über 60 % der Aktivität von $^{51}\text{CrCl}_3$ im übrigen Tierkörper zu finden ist. Es ist außerdem festzuhalten, dass, mit Blick auf die spezifische Aktivität der Organe, ein nicht geringer Teil von ionischem ^{51}Cr in

der Niere zu finden ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein Teil des ionischen Chroms unmittelbar über die Nieren ausgeschieden wird. Erhöhte Werte in Herz und Lunge können darauf hinweisen, dass die Organe trotz Perfusion noch Blut enthielten, mit dem noch Aktivität zirkulierte.

Der Organverteilung nach 2 h nach zu urteilen, ist die ^{51}Cr Markierung repräsentativ für die Verteilung von SPIOs in den Organen. Ähnliche Ergebnisse nach partikokinetischen Untersuchungen von ^{59}Fe -markierten SPIOs wurden schon in früheren Arbeiten gefunden^{9,84}. Es wurde gezeigt, dass 1-2 h nach intravenöser Gabe über 80 % der Nanopartikel in der Leber wiederzufinden sind und die Milz einen, unter Berücksichtigung des Organgewichts, vergleichbaren Anteil aufnimmt.

Diese Ergebnisse sind nicht weiter verwunderlich, da Leber und Milz einen Großteil an Zellen beisteuern, die das Mononukleäre Phagozyten System (MPS) ausmachen¹⁸. Auf diese speziellen Zellen wird in Kapitel 3.2 näher eingegangen.

Betrachtet man nun die Organverteilung nach einem langen Zeitraum (4 w), gibt dies Aufschluss über eine mögliche Umverteilung von ^{51}Cr (Abbildung 3.6). Wieder ist deutlich, dass sich die Aktivität nach Gabe in Form von ^{51}Cr SPIOs deutlich anders verteilt als nach Gabe in Form des ionischen Tracers. Die ^{51}Cr -Markierung, die von SPIOs ausging, befindet sich nach wie vor zum größten Teil in der Leber. Die Milz enthält ebenfalls einen nicht zu vernachlässigen Teil; bezugnehmend auf das Organgewicht liegt sogar mehr in der Milz als in der Leber vor. Die Aktivität nach Gabe der Tracerdosis hat sich nach 4 w ebenfalls, neben der vermutlichen Ablagerung ins Endothel der Blutgefäße, zu einem gewissen Teil in Leber und Milz eingelagert. Dennoch bleibt die Organverteilung der ^{51}Cr -Aktivität, die in Form von SPIOs und ionischem Chrom appliziert wurde, auch nach vier Wochen noch sehr verschieden.

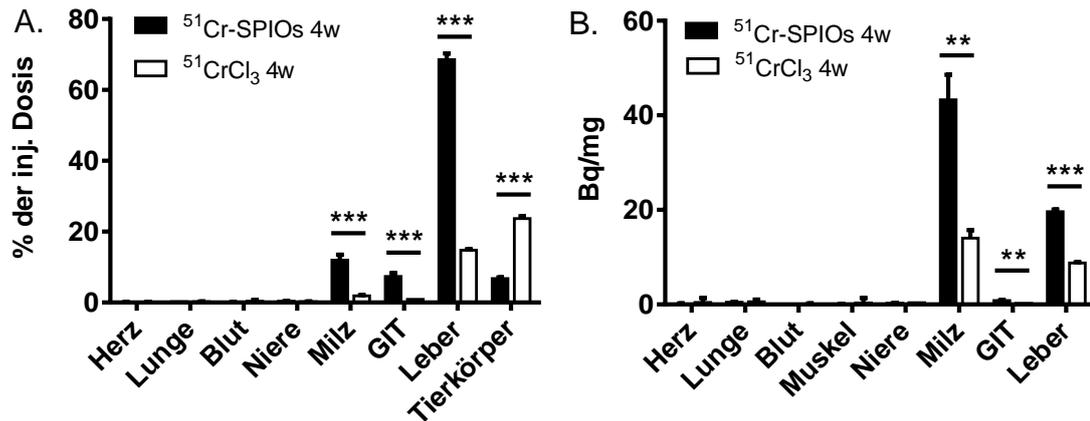


Abbildung 3.6: Organverteilung von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ nach 4 w. A.) Prozentuale Organverteilung und B.) spezifische Aktivität von Organen 4 w nach Injektion von ^{51}Cr -markierten SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ in die Schwanzvene. GIT = Gastrointestinaltrakt, Mittelwert +/- s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Wie unterschiedlich sich die beiden Formen verhalten ist auch in der Ganzkörperretention (GKR) zu sehen (Abbildung 3.7 A.), die in lebenden Tieren mit einem Ganzkörperzähler gemessen wurde. Während ein großer Teil der ^{51}Cr -Aktivität, von ionischem Chrom stammend, in den ersten zwei Tagen vom Körper ausgeschieden wird, wird die Aktivität von ^{51}Cr -SPIOs über den Messzeitraum von vier Wochen vom Körper fast vollständig zurückgehalten. Dieser geringe Anteil der ausgeschiedenen Menge wurde fast ausschließlich im Kot wiedergefunden (Abbildung 3.7 B.). Ionisches Chrom wurde dagegen überwiegend über die Nieren ausgeschieden, wie auch die Organverteilung nach 2 h vermuten ließ. Allerdings stellt sich nach etwa einer Woche ein Plateau ein, in dem es nur noch stark verringert zu einer Ausscheidung kommt.

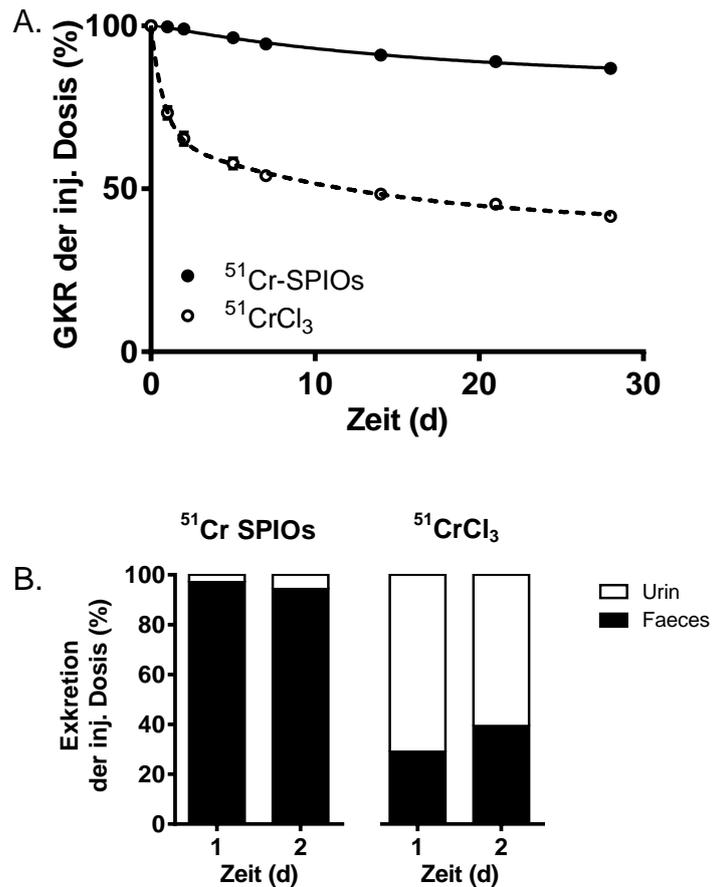


Abbildung 3.7: Ganzkörperretention und Exkretion von ^{51}Cr . A.) Ganzkörperretention von ^{51}Cr -SPIOs bzw. $^{51}\text{CrCl}_3$. B.) Exkretionswege der Aktivität nach Injektion beider Formen in Mäuse. $n \geq 3$

Die Messung der Ganzkörperretention bietet die Möglichkeit, pharmakokinetische Parameter der Verteilung von ^{51}Cr zu ermitteln. In der Pharmakokinetik werden z.B. zur Beschreibung von Medikamentenkonzentrationen üblicherweise Modellrechnungen mit sogenannten Kompartiment-Modellen durchgeführt. Dabei werden bestimmte Bereiche des Organismus, wie z.B. Organe, als Kompartimente bezeichnet (Abbildung 3.8). Diesen Kompartimenten werden unterschiedliche Konzentrationen des Arzneimittels zugeschrieben, anhand derer sich die Eliminierung erklären lässt. Das Schema lässt sich auch auf die Eliminierung von Nanopartikeln anwenden. Das einfachste Modell, das Ein-Kompartiment-System, behandelt den Körper wie eine große Wanne. Bei Gabe eines Pharmakons verteilt es sich rasch über das Plasma homogen über das gesamte Volumen des Körpers und wird im Verlauf in einer konzentrationsabhängigen Geschwindigkeit ausgeschieden. Im Falle einer linearen Konzentrationsabhängigkeit ergibt sich für die Eliminationsgeschwindigkeit die Exponentialfunktion

$$C(t) = C(0)e^{-k_e t}$$

mit k_e als Eliminationskonstante. Selten jedoch lassen sich Konzentrationsverläufe so simpel beschreiben.

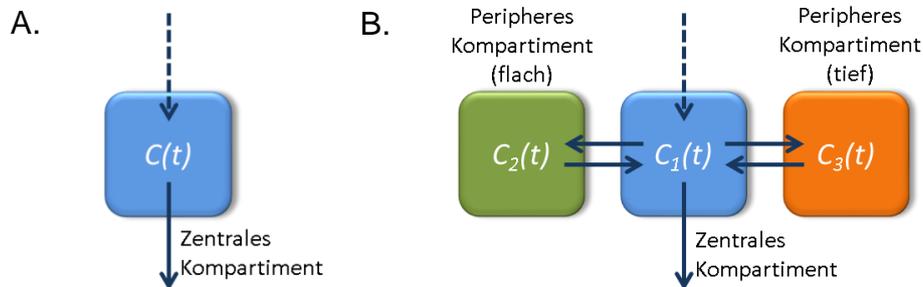


Abbildung 3.8: Pharmakokinetische Modelle. A.) 1-Kompartiment-System. B.) 3-Kompartiment-System.

Überwiegend wendet man zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Medikamenten 2- oder 3-Kompartiment-Modelle an. Hier spielen in Bezug auf die Ausscheidung neben dem zentralen Kompartiment, zu dem das Blut und gut durchblutete Organe wie z.B. Leber und Niere zählen, auch periphere Kompartimente (weniger gut durchblutete Organe wie Muskel und Haut) eine Rolle. Beim 3-Kompartiment-System unterteilt man das periphere Kompartiment noch in oberflächliches und tiefes Kompartiment.

Ein mathematischer Fit der GKR-Messwerte von $^{51}\text{CrCl}_3$ ergibt den typischen Verlauf eines 3-Kompartiment-Modells. Die Kurve stellt eine Exponentialfunktion mit drei Termen dar

$$C = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} + C_3 e^{-k_3 t}$$

mit Halbwertszeiten von zu Beginn 0,2, dann 2,1 und schließlich ca. 65 Tagen. Die Elimination findet ausschließlich über das zentrale Kompartiment statt und verläuft zunächst zügig, hier über die Niere. Im weiteren Verlauf jedoch nimmt die Verteilung in periphere Gewebekompartimente an Bedeutung zu, wie die hier vermutete Ablagerung ins Endothel. Eine Umverteilung geschieht nur langsam und entsprechend verlangsamt sich die Elimination. Die Retentionskurve von ^{51}Cr -SPIOs zeigt in den ersten zwei Tagen gar keine Eliminierung, eine sogenannte *lack phase*. Mit Hilfe eines Korrekturterms wurde ein 2-Kompartiment-Modell für einen Fit herangezogen. Die berechnete Funktion gibt eine relativ kurze Halbwertszeit der Aktivität von zunächst 12 Tagen an und eine anschließende sehr lange Halbwertszeit, die auf einige wenige Jahre geschätzt, aber nicht genau ermittelt werden kann. Die Schwierigkeit an die Messwerte einen Fit anzulegen bzw. ein

pharmakokinetisches Modell anzuwenden, weisen auf einen ungewöhnlichen Konzentrationsverlauf hin.

Die extremen Unterschiede in der Organverteilung und der Ganzkörperretention von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ lassen sich durch Prozesse erklären, die nach der Aufnahme in Zellen ablaufen. Wie anhand der Organverteilung zu erkennen ist und wiederholt in der Literatur beschrieben wurde, werden polymerverpackte SPIOs größtenteils von der Leber aufgenommen werden. In Zellen der Leber wird der SPIO rasch abgebaut⁸⁴. Bei der intrazellulären Degradation des ^{51}Cr -markierten Eisenoxid-Nanokristalls in Endosomen werden neben $^{51}\text{Cr}^{3+}$ -Ionen vor allem Fe^{2+} - bzw. Fe^{3+} -Ionen freigesetzt. Die Transportwege für ionisches Eisen sind ausführlich in der Literatur beschrieben. In den Endosomen freigewordene Eisen-Ionen werden von der Metalloreduktase Steap3 zu Fe^{2+} reduziert und über den Divalenten Metall-Transporter DMT1 durch die Endosom-Membran ins Zytoplasma transportiert. Unter strenger Kontrolle der Homöostase folgt der Transport über den Eisenexporter Ferroportin in den Extrazellularraum, wo es nach der Oxidation durch Hephästlin zu Fe^{3+} an Transferrin gebunden wird¹¹⁴. Das beladene Transferrin ist für den Eisentransport und die Versorgung von Zellen mit Eisen verantwortlich. Dieser Mechanismus ist bei Mäusen und Menschen gleich. Abbildung 3.9 zeigt schematisch wie man sich den Transport von, von SPIOs freigesetztem, Eisen vorstellen kann.

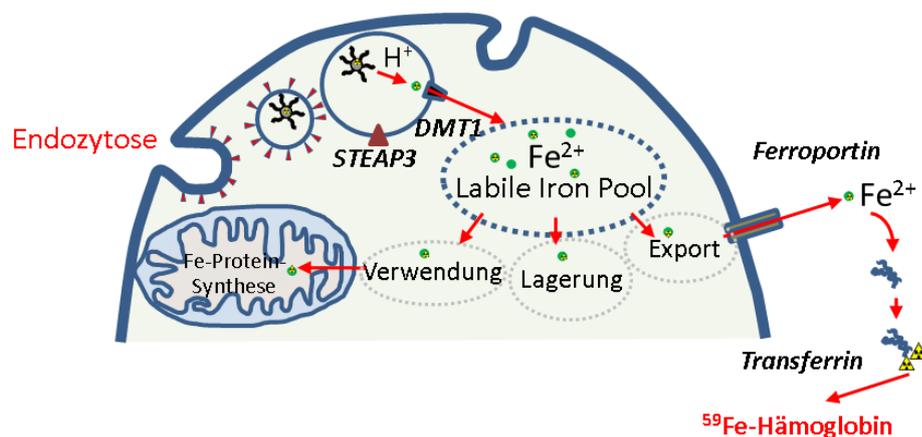


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Prozessierung von polymerverpackten SPIOs. Aufnahme und Degradation von der SPIOs und Mobilisierung des frei werdenden Eisens zur Bereitstellung für den zellulären Eisenpool. Abbildung modifiziert nach⁹⁷.

Diese Vorgänge erklären warum die Ganzkörperretentionen von ^{59}Fe nach intravenöser Injektion von ^{59}Fe -SPIOs bzw. $^{59}\text{FeCl}_3$ eine ähnliche Form zeigen (Abbildung 3.10). Die Retentionskurve von ^{59}Fe -SPIOs ist lediglich leicht

rechtsverschoben, was bedeutet, dass die Ausscheidung verzögert stattfindet. Das $^{59}\text{Fe}^{3+}/^{59}\text{Fe}^{2+}$ muss zunächst durch den Abbau der Nanokristalle verfügbar gemacht werden, folgt dann aber den natürlichen Stoffwechselwegen von Eisen.

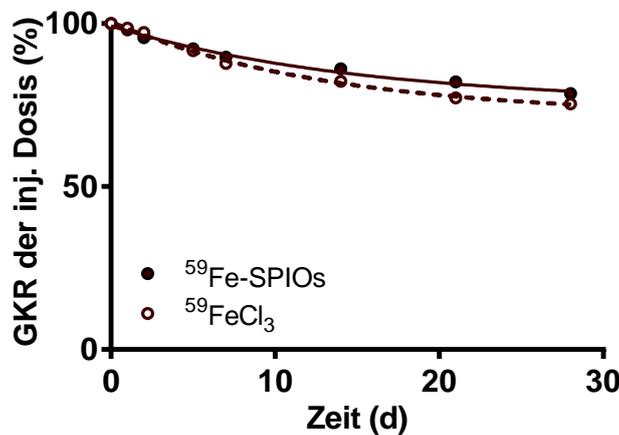


Abbildung 3.10: Ganzkörperretention von ^{59}Fe -SPIOs bzw. $^{59}\text{FeCl}_3$.

Die Retentionskurven von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ verhalten sich dagegen völlig unterschiedlich, was darauf schließen lässt, dass freiwerdendes Cr^{3+} von abgebauten SPIOs anders metabolisiert wird als jenes von $^{51}\text{CrCl}_3$. Die Prozessierung von ionischem Chrom ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Schwarz und Mertz beschrieben 1957 Chrom als ein essentielles Spurenelement, welches eine wichtige Funktion in der Regulierung von Insulin und somit des Blutzuckerspiegels hat¹¹⁵. In den nächsten fünfzig Jahren der Forschung sind große, neue Erkenntnisse über den Chrom-Stoffwechsel, trotz zahlreicher Publikationen, ausgeblieben und Mechanismen weiter ungeklärt, so dass die Rolle von Chrom als Spurenelement mittlerweile in Frage gestellt wird^{88,116}.

Es kann festgehalten werden, dass die Verteilung der ^{51}Cr -Aktivität nach vier Wochen nicht mehr repräsentativ für den, zu diesem Zeitpunkt schon degradierten, SPIO ist. Während das frei gewordene Eisen in den Eisenpool des Organismus eingespeist wurde, scheint das freigesetzte Cr^{3+} in den betreffenden Leberzellen zurückgehalten zu werden. Die Vermutung liegt nahe, dass ein spezifischer Me^{3+} -Exporter in Zellen für Chrom fehlt und darin liegendes Chrom in den Zellen gefangen ist. Es wird beschrieben, dass Chrom durch das Eisentransportprotein Transferrin transportiert wird und im Umkehrschluss weitere andere Metalloproteine für den unspezifischen, zellulären Im- und Export von Chrom verantwortlich sind^{117,118}. Die hier

vorgestellten Ergebnisse sprechen jedoch dagegen bzw. zeigen, wie gering dieser Beitrag nur sein kann. Wir beobachten eine sehr lange Retention der ^{51}Cr -Aktivität, besonders nach Gabe von ^{51}Cr -SPIOs. Eine fast fehlende Umverteilung trotz Alterung und Apoptose der Zellen, welche ^{51}Cr -SPIOs oder $^{51}\text{CrCl}_3$ durch Endozytose aufgenommen haben, könnte durch folgende Vorstellung erklärt werden. Alle Zellen sterben einmal durch den programmierten Zelltod. Apoptotische Zellen werden entweder von gewebsansässigen, professionellen oder direkt benachbarten, nicht-professionellen Makrophagen beseitigt^{119,120}. Dies sind zur Phagozytose fähige Zellen, welche die sterbenden bzw. toten Zellen entweder in ihrer Gesamtheit oder in Form von apoptotischen Vesikeln aufnehmen. Es findet ein natürliches *Recycling* der Zellbestandteile statt. Das Chrom bleibt möglicherweise aber erneut in der Zelle gefangen bis auch diese den programmierten Zelltod durchläuft. Diese Betrachtungsweise könnte die extrem lange Retention von ^{51}Cr (in der Leber), wenn es in Form von SPIOs injiziert wurde, erklären. Die Frage inwiefern eine Umverteilung und Ansammlung der Aktivität in Milz und Leber, besonders bei der Gabe in Form von CrCl_3 , stattfinden kann, bleibt aus dieser Sicht unklar. Unter der Annahme, dass einige apoptotische Vesikel zunächst im Blut zirkulieren und im späteren Verlauf von Milz oder Leber beseitigt werden, wäre eine Umverteilung vorstellbar. Diese Art des Transfers wurde bereits in Bezug auf Onkogene beschrieben^{121,122}. Jedoch kann sich eine Zelle auch von Zellmaterial befreien, ohne dass sie gleich im Ganzen stirbt. Zellen sind in der Lage Exosome abzuspalten. Eine weitere Art von Membranvesikeln sind sogenannte endotheliale Mikropartikel (EMP), die speziell von vaskulären Endothelzellen gebildet werden können. Die Aufgaben von sowohl Exosomen als auch EMPs sind vielfältig und teilweise noch ungeklärt^{123,124}. Aber auch sie bieten eine Erklärung für eine Umverteilung von Aktivität. Speziell im Fall von $^{51}\text{CrCl}_3$ ist dadurch ein Transport von wahrscheinlich Endothelzellen in Zellen der Milz und Leber denkbar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine stabile, radioaktive Markierung von SPIOs mit einem elementfremden Nuklid, hier $^{51}\text{Cr}^{3+}$, erfolgreich durchgeführt wurde. Diese Form der Radiomarkierung ermöglicht die Untersuchung der Bioverteilung von intakten SPIOs im Körper im Zeitfenster von vielleicht bis zu zwei Stunden, kann aber keine Aussagen über den anschließenden Abbau von SPIOs treffen, weil hier die Transportwege von $\text{Fe}^{2+/3+}$ und Cr^{3+} offensichtlich zu unterschiedlich sind.

Die Tatsache, dass Chrom aus der Nahrung nur in sehr geringen Mengen aufgenommen wird, erschwert die Analysen hinsichtlich der Transportwege von Chrom. Insofern bieten ^{51}Cr -markierte SPIOs nicht nur einen Ansatz, die

Kurzzeitverteilung von SPIOs zu untersuchen, sondern auch vermehrt Chrom in Zellen der Leber zu bringen und so Transportwegen dieses Elements nachzugehen. Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen eher gegen spezifische Transportwege, wie sie nötig sein müssten um bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels beteiligt zu sein.

Die offensichtlich unterschiedliche Metabolisierung von Chrom und Eisen kann man sich auch zu Nutzen machen, z.B. um kinetische Experimente bezogen auf die frühe Degradation von SPIOs durchzuführen und zu untersuchen ob es eine intestinale Absorption von intakten polymerverpackten SPIOs gibt. Die Aufnahme von intakten Nanopartikeln durch Absorption im Gastrointestinaltrakt ist ein wichtiges Thema im Bereich der Nanotoxikologie. In unserer Arbeitsgruppe wurden ^{59}Fe - und ^{51}Cr -markierte SPIOs dazu verwendet um genau dies zu untersuchen. Da ionisches Eisen über den Darm aufgenommen wird, kann die Freisetzung von $^{59}\text{Fe}^{3+}$ durch Degradation von ^{59}Fe -SPIOs im Magen eine Absorption des *Labels* zur Folge haben, die nicht die Absorption der intakten Partikel widerspiegelt. Die intestinale Absorption von ionischem Chrom hingegen ist im Vergleich mit ionischem Eisen extrem niedrig. So konnten Untersuchungen zur Aufnahme nach oraler Applikation von ^{51}Cr -markierten SPIOs zeigen, dass eine relevante unspezifische Aufnahme intakter Teilchen dieser Art ausgeschlossen werden kann¹²⁵.

3.1.3 Radiomarkierung von Qdots mit ^{65}Zn

3.1.3.1 Austauschmarkierung

In diesem Teil der Arbeit wird eine Radiomarkierung von Kern/Schale/Schale QDs mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ vorgestellt. Aufgrund der Heterogenität von QDs kommen verschiedene Isotope zur Markierung in Frage. Einige wenige Beispiele von in der Literatur beschriebenen radiomarkierten QDs sind $\text{Cd}^{125\text{m}}\text{Te}/\text{ZnS}$ QDs von Woodward et al. (2007) und $\text{CdTeSe}/^{109}\text{CdZnSe}$ QDs von Sun et al. (2012)^{86,87}. Beide Radiomarkierungen wurden durch eine radioaktive Synthese erreicht, bei denen entweder der Kern oder die Schale markiert wurde. Bei $^{125\text{m}}\text{Te}$ (t_{1/2}=57,4 d, γ -Strahler, 144,8 keV) handelt es sich um ein Nuklid welches eine ähnliche Zerfallscharakteristik besitzt wie ^{125}I und ist somit, wie auch ^{109}Cd (t_{1/2}=461,4 d, γ -Strahler, 88,0 keV), ein weicher Gammastrahler. Eine radioaktive Synthese setzt immer eine Miniaturisierung des Ansatzes voraus, um eine angemessene spezifische Aktivität der Partikel zu erreichen und der nötige radioaktive Präkursor muss kommerziell erhältlich oder zumindest einfach herzustellen sein. Die Halbwertszeit spielt ebenfalls eine Rolle bei der Wahl des zu verwendenden Nuklids. Eine postsynthetische

Austauschmarkierung nach Freund wie sie bei den ^{51}Cr -SPIOs angewandt wurde, würde diese Schwierigkeiten umgehen⁸⁵. In dieser Arbeit wurde für die Radiomarkierung von CdSe/CdS/ZnS QDs $^{65}\text{Zn}^{2+}$ zur Radiomarkierung der äußeren ZnS Schale verwendet. Bei ^{65}Zn handelt es sich um einen harten Gammastrahler ($t_{1/2}=244,3$ d, γ -Strahler, 1115,5 keV), der es erlaubt die Aktivität in lebenden Versuchstieren in einem Ganzkörperzähler zu messen, wie es bei ^{125m}Te und ^{109}Cd nicht der Fall wäre. Dies hat den Vorteil, dass, wie bei ^{51}Cr - bzw. ^{59}Fe -SPIOs, die Ganzkörperretention gemessen werden kann und Schlüsse auf die Partikokinetik zulässt.

Der Versuchsaufbau verlief analog zu der Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr (Abbildung 3.11). Die Oberfläche der Halbleiter-Nanokristalle ist mit Stabilisatormolekülen versehen. In Chloroform wurden die QDs mit wasserfreiem $^{65}\text{ZnCl}_2$ inkubiert und anschließend mit dem schon beschriebenen amphiphilen Polymer verpackt.

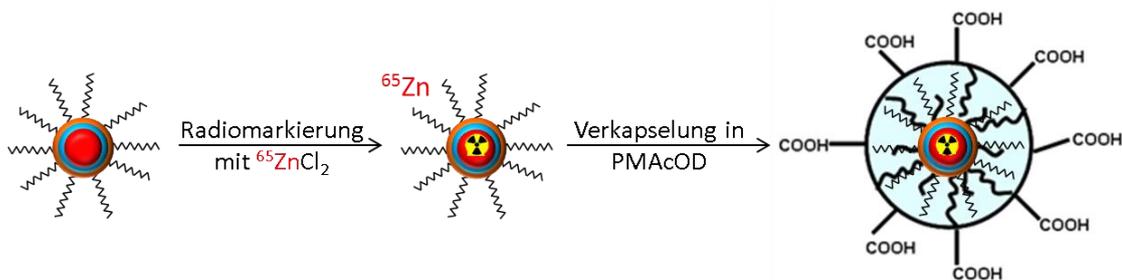


Abbildung 3.11: Postsynthetische Radiomarkierung von CdSe/CdS/ZnS QDs. QDs wurden in Chloroform mit wasserfreiem $^{65}\text{ZnCl}_2$ inkubiert. Zur Überführung der hydrophoben Partikel in wässrige Medien wurden sie mit PMAOD verpackt.

Als erstes wurden 2, 4 und 24 h nach dem Ansetzen mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ Aliquots entnommen und die Quantum Dots mittels Methanol gefällt, um zu prüfen zu welcher Zeit die Inkorporation von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ abgeschlossen ist. Zu allen Zeitpunkten war das ^{65}Zn -Label zum Großteil mit den QDs lokalisiert (~75 %), so dass anzunehmen war, dass die Reaktion schnell abläuft und nach kurzer Zeit abgeschlossen war (Abbildung 3.12 A.). Als nächstes wurde eine SEC der verpackten QDs durchgeführt, um zu prüfen, ob das ^{65}Zn -Label stabil in die QDs inkorporiert wurde. Die UV-Absorption bei 280 nm zeigt einen kleinen Peak bei etwa 15 min und einen großen Peak bei etwa 24 min. Der Peak bei 15 min weist auf wenige agglomerierte Partikel durch den Verpackungsprozess hin. Der Großteil der Partikel liegt monodispers vor und eluiert nach etwa 24 min. Die Radioaktivität wurde in den einzelnen Fraktionen des Eluats gemessen und mit dem Elutionsprofil der Partikel, gegen die Zeit aufgetragen, verglichen (Abbildung 3.12 B.). Es ist zu erkennen, dass der Großteil der

Aktivität mit den QDs bei 15 und 24 min koeluiert. Jedoch war auch in der Fraktion von 40 min Radioaktivität zu messen, und das obwohl die QDs zuvor über eine Filtereinheit (10 kDa) von freien Zinkionen bereinigt wurden.

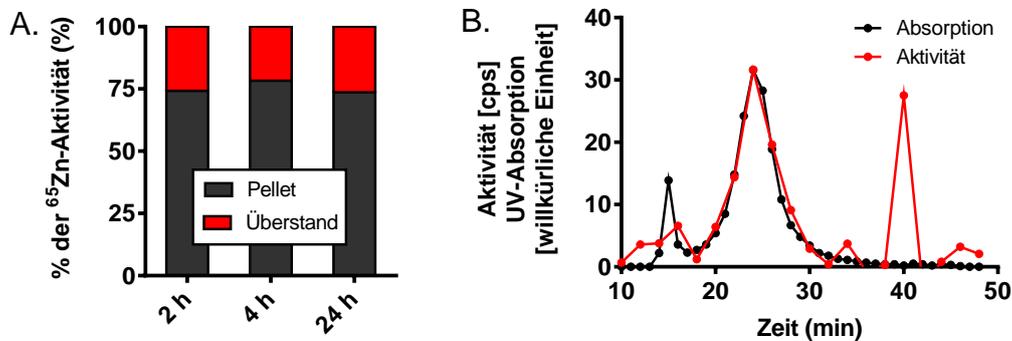


Abbildung 3.12: Überprüfung des Einbaus von ⁶⁵Zn in QDs. A.) Fällung von unverpackten QDs nach dem Rühren mit wasserfreiem ⁶⁵ZnCl₂ und Lokalisierung der Aktivität. B.) SEC von verpackten ⁶⁵Zn QDs. Halbleiter-Nanokristalle und *Label* koeluiieren. Jedoch war auch Aktivität in der Fraktion bei 40 min zu messen, die ungebundenen Zinkionen zugeordnet wird.

Weitere Stabilitätskontrollen beinhalteten einen Filterversuch, so wie die Dialyse der radiomarkierten polymerverpackten Partikel. Beim Filterversuch wurde eine Charge radiomarkierter und verpackter QDs über einen 10 kDa Zentrifugenfilter gefahren und die Aktivität in Filter und Filtrat gemessen (Abbildung 3.13 A.). Die konzentrierten QDs wurden in PBS resuspendiert und wiederholt gefiltert. Insgesamt wurden drei Filtrationsgänge durchgeführt. Aktivität im Filter entspricht einer Kolokalisation des *Labels* mit den Partikeln, Aktivität im Filtrat dagegen dem Verlust des freien *Labels*. Im Filtrat waren nach der ersten, zweiten und dritten Filtration 22.6, 10.6 und 5.4 % der Aktivität zu messen. Ein relativ hoher Grad an freien ⁶⁵Zn-Ionen vor der ersten Filtration könnte der Verpackungsmethode geschuldet sein, bei der im letzten Schritt ⁶⁵Zn-Ionen enthaltender Überstand nicht komplett entfernt wurde. Da nach dem jeweiligen Entfernen der Zink-Ionen in den folgenden Schritten wieder Zink-Ionen gelöst schienen, könnte der Verlust der Aktivität auf ein Ausbluten des radioaktiven ⁶⁵Zn²⁺ hindeuten. Diese Beobachtung ließ sich auch bei der Dialyse von polymerverpackten ⁶⁵Zn-QDs gegen PBS machen. Der Dialysepuffer wurde alle 24 h gewechselt. Nach dem ersten Tag waren 32.2 % der Aktivität im Dialysepuffer zu messen. Weitere 3.4, 3.4 und 4.5 % Verlust der Aktivität durch Dialyse folgten am zweiten, dritten und vierten Tag (Abbildung 3.13 B.).

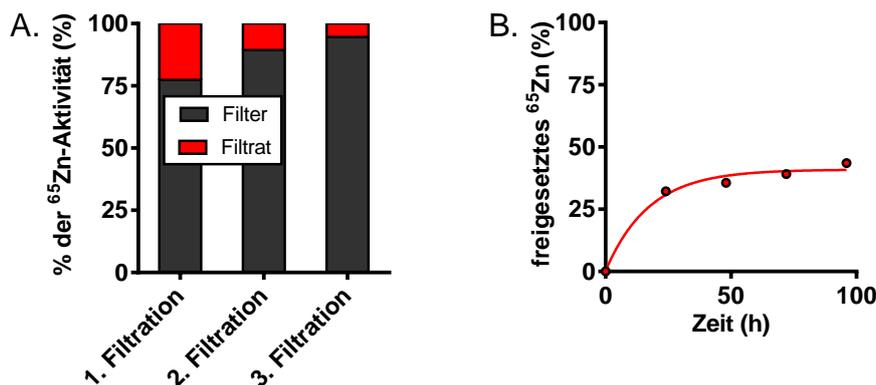


Abbildung 3.13: Untersuchung der Stabilität von ^{65}Zn -markierten QDs. A.) zeigt die Verteilung der ^{65}Zn -Aktivität zwischen Filter und Filtrat bei wiederholter Filtration über einen 10 kDa Zentrifugationsfilter an. B.) zeigt den Verlust des ^{65}Zn -Labels bei der Dialyse gegen PBS.

Auch wenn ganz klar eine Markierung von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ durch Inkubation mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ im QD stattfindet, scheint das ^{65}Zn -Label nicht stabil in den Nanokristall integriert. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass nicht ein Austausch von Zinkionen im Kristallgitter stattfindet, sondern eher ein Aufwachsen auf die äußere Schale. Nach der Überführung in die wässrige Phase durch die Verpackung in das amphiphile Polymer, könnte es dann zu einem langsamen Auflösungsprozess dieser zusätzlichen Schicht kommen. Es erscheint auch möglich, dass zwar ein Austausch von Zinkisotopen erfolgt, sich nach der Überführung ins Wässrige jedoch der Nanokristall insgesamt langsam aber stetig auflöst. Solch ein Phänomen wurde bereits für Silber-Nanopartikel beschrieben, auf welches zudem dessen antimikrobielle Wirkung zurückgeführt wird^{126,127}.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich durch eine radioaktive Synthese von $\text{CdSe/CdS}/^{65}\text{ZnS}$ QDs die beschriebenen Probleme des langsamen Verlusts des Labels nach postsynthetischer Radiomarkierung umgehen lassen.

3.1.3.2 Radioaktive Synthese von Quantum Dots

3.1.3.2.1 Radioaktive Synthese von $\text{CdSe/CdS}/^{65}\text{ZnS}/\text{ZnS}$ QDs

Dieser Teil der Arbeit fand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Alexander Eychmüller (Institut für physikalische Chemie der Technischen Universität Dresden) statt. Christoph Bauer übernahm die Aufgabe die Synthese von CdSe/CdS Teilchen auf eine möglichst kleine Ansatzgröße herabzusetzen. In Zusammenarbeit wurde dann eine radioaktive ^{65}ZnS Schale aufgewachsen, die mit einer weiteren Lage nicht radioaktiven ZnS geschützt wurde. Der Schritt der Miniaturisierung ist notwendig, um aus Sicht der

Strahlenbelastung für den Experimentator bei der Synthese keine unakzeptablen hohen ^{65}Zn -Dosen einsetzen zu müssen, um eine ausreichend hohe spezifische Aktivität der Kern/Schale/Schale QDs für Tierversuche zu erhalten. Die Synthesen wurden mit vergleichsweise niedrigen Aktivitäten durchgeführt und optische Eigenschaften geprüft. Die Absorptionsspektren von kalten und heißen QDs sind sich sehr ähnlich (Abbildung 3.14 A.). Es erfolgte keine Messung der Emissionsspektren, aber ein optischer Vergleich lässt vermuten, dass die heißen Partikel bei gleicher Wellenlänge emittieren wie die Kalten und ebenso eine ähnliche Fluoreszenzquantenausbeute besitzen (Abbildung 3.14 B.).

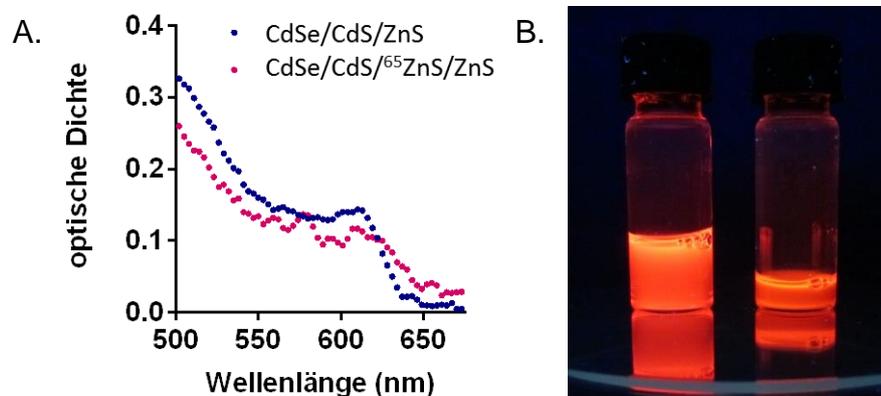


Abbildung 3.14: Charakterisierung radiomarkierter CdSe/CdS/ZnS QDs. A.) Absorptionsspektren von nicht radiomarkierten und radiomarkierten CdSe/CdS/ZnS Quantum Dots. B.) links kalte, rechts heiße QDs.

Die Ausbeuten im Einbau der Aktivität lagen bei über 60 %. Zur Prüfung der Stabilität der ^{65}Zn -Markierung wurde ein Fällungsexperiment durchgeführt. Die synthetisierten QDs in Chloroform wurden mit Isopropanol/ Methanol gefällt, der Überstand abgenommen und die QDs erneut in Chloroform aufgenommen. Die Fällung wurde zwei Mal wiederholt. Die ^{65}Zn -Aktivität befand sich in allen drei Durchgängen fast ausschließlich im Pellet der QDs (Abbildung 3.15). Daher kann davon ausgegangen werden, dass das ^{65}Zn bei der Synthese in die ZnS Schale der QDs eingebaut wurde und sich durch Fällung der Partikel nicht entfernen lässt.

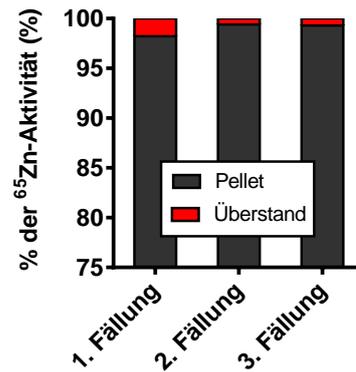


Abbildung 3.15: Fällung der Partikel und Lokalisierung der Radioaktivität zwischen Pellet und Überstand.

Da die Partikel für ihre weitere Anwendung wasserlöslich sein müssen, wurden die radioaktiven QDs mit dem amphiphilen Polymer verpackt. Die Verpackung führte zu einem Verlust der Aktivität von ca. 90 %. Mit der geringen Restaktivität in den Teilchen wurde ein Filterversuch durchgeführt. Die radioaktiv synthetisierten und verpackten QDs wurden über einen 10 kDa Zentrifugenfilter vom wässrigen Puffer getrennt und die Aktivität in Filter und Filtrat gemessen. Die konzentrierten QDs wurden wieder in PBS resuspendiert und zwei weitere Male, immer nach Resuspension, gefiltert. Der erste große Verlust der Aktivität von über 35 % kann auf die Aufarbeitung nach der Verpackung zurückzuführen sein. Im weiteren Verlauf befinden sich noch mal etwa 8 % und nach der dritten Filtration knapp 2 % im Filtrat wieder (Abbildung 3.16). Die QDs mit der verbliebenen Restaktivität wurden dann drei Mal für je fünf Minuten mit Ultraschall behandelt (etwas kürzer als in der Verpackungsanleitung) und danach über eine 10 kDa Zentrifugationseinheit gefiltert. Nach der Behandlung mit Ultraschall waren wieder ungefähr 20 % der Aktivität in den Puffer übergegangen.

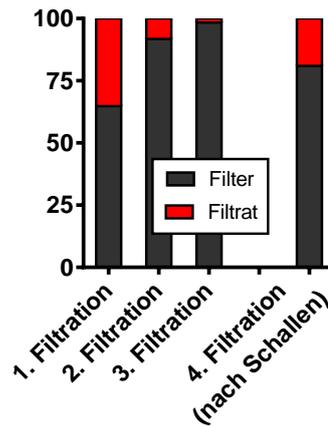


Abbildung 3.16: Filtration von radiomarkierten, polymerverpackten QDs und Lokalisierung der Radioaktivität.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der entscheidende Verlust der Radioaktivität aus den QDs durch die Verpackung entsteht, bei der die Partikel offenbar extrem mechanisch strapaziert werden. Nach der ersten Filtration ist zwar ein nur sehr schwaches Ausbluten von freien ^{65}Zn -Ionen zu erkennen, die nach der Verpackung kaum verbleibende Aktivität in den QDs macht die radioaktive Synthese jedoch unattraktiv. Ein hoher wenn auch geringerer Verlust der, zuvor in die Nanoteilchen eingebauten, Radioaktivität nach dem Verpackungsprozess wurde auch bei der Austauschmarkierung festgestellt. Diesen Effekt könnte man eventuell dadurch reduzieren oder gar beseitigen, wenn man nicht die äußerste Schale, sondern den Kern oder die mittlere Schale markiert, wie es bereits Woodward et al. machten⁸⁶.

3.1.3.2.2 Radioaktive Synthese $\text{Mn}^{65}\text{ZnSe/ZnSe}$ QDs

Dieser Teil der Arbeit fand ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Alexander Eychmüller statt. Christian Waurisch übernahm die Entwicklung einer miniaturisierten Synthese von mangandotierten QDs. Diese Art QDs haben den Vorteil kein toxisches Cadmium zu enthalten, was sie für die Anwendung im menschlichen Körper interessant macht. Zunächst wurden die MnSe-Kerne synthetisiert und im Anschluss wurde die ^{65}Zn -Markierung eingefügt, die mit einer weiteren ZnSe-Schale geschützt werden sollte. Die Absorptionsspektren von kalten und heißen mangandotierten QDs wurden geprüft (Abbildung 3.17).

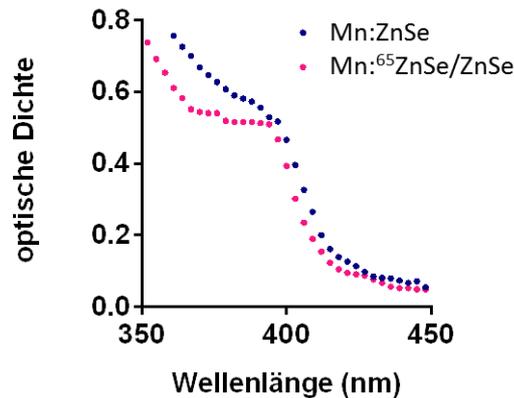


Abbildung 3.17: Absorptionsspektren von nicht radiomarkierten und radiomarkierten Mn:ZnSe QDs.

Es konnte festgestellt werden, dass die radioaktiv markierten QDs im Vergleich mit den nicht radiomarkierten Mn:ZnSe QDs ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum aufweisen. Die Ausbeute beim Einbau der Aktivität lag bei etwa 30 % und die Fluoreszenzquantenausbeute war optisch gering. Das schwerwiegendste Problem war jedoch, dass die mangandotierten QDs sich nicht mit dem hier verwendeten amphiphilen Polymer verpacken ließen, da sie der mechanischen Beanspruchung nicht standhielten. Für den Transfer in wässrige Medien wäre eine andere Verpackungsmethode notwendig gewesen, mit der eine Vergleichbarkeit der hier verwendeten Partikel nicht mehr gewährleistet wäre.

Insgesamt wurde mit der Austauschmarkierung von CdSe/CdS/ZnS QDs mit ⁶⁵Zn die effektivste Radiomarkierung erreicht. Unter Rücksichtnahme, dass das ⁶⁵Zn-Label nach der Austauschmarkierung ein schwaches Ausbluten der Markierung zeigt, wurden dennoch grundlegende partikokinetische Eigenschaften von CdSe/CdS/ZnS QDs wie die Organverteilung untersucht. Die radiomarkierten und polymerverpackten QDs wurden jeweils unmittelbar vor der Administration über einen 10 kDa Zentrifugationsfilter von dem ersten großen Schub von freien ⁶⁵Zinkionen bereinigt.

3.1.4 Partikokinetische Untersuchungen

Wie in vorangegangenen Untersuchungen der ⁵¹Cr-SPIOs wurden hier ⁶⁵Zn-QDs in die Schwanzvene von Versuchsmäusen injiziert und 2 h bzw. 4 w nach Gabe die Organe entnommen und deren Aktivität gemessen (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.20). Als Kontrolle wurde einer weiteren Gruppe dieselbe Aktivität in Form von der Verbindung in die Schwanzvene injiziert, die auch zur Radiomarkierung verwendet wurde, ⁶⁵ZnCl₂.

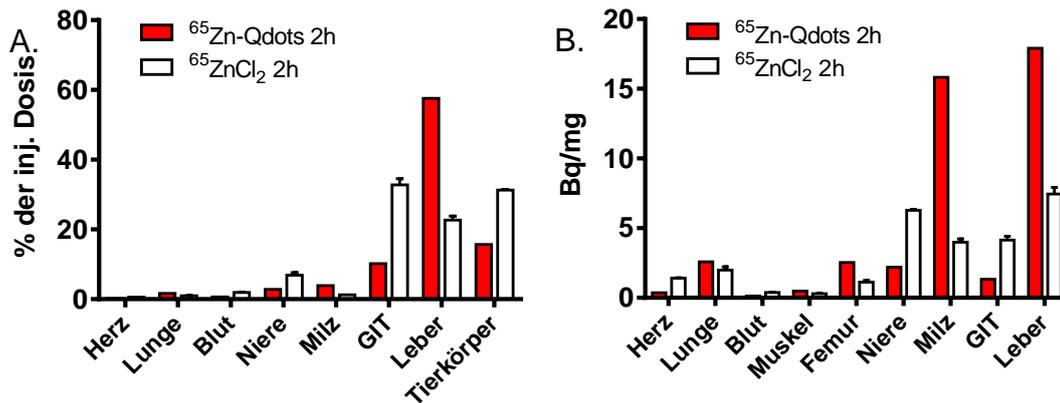


Abbildung 3.18: Organverteilung von ^{65}Zn -QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach 2 h. A.) Prozentuale Organverteilung und B.) spezifische Aktivität von Organen 2 h nach Injektion von ^{65}Zn -markierten QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$ in die Schwanzvene. GIT = Gastrointestinaltrakt, Mittelwert +/- s.e.m. mit $n \geq 1$

In der prozentualen Organverteilung nach 2 h zeigt sich, dass knapp 60 % der QDs von der Leber aufgenommen wurden. Ein nicht zu vernachlässigender Teil befindet sich in der Milz (ca. 4 %), aber auch im Gastrointestinal Trakt (etwa 10 %), welcher bezüglich der spezifischen Aktivität jedoch kaum ins Gewicht fällt (Abbildung 3.18 A. und B.). Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit Sun et al. und Freund und bestätigt die Aufnahme von PMAOD-verpackten Partikeln dieser Größe in Organe des MPS^{84,87}. Auffällig ist der deutliche Unterschied in der Organverteilung zwischen ^{65}Zn -QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$, der für die Verlässlichkeit des ^{65}Zn -Labels spricht.

An dieser Stelle erhebt sich wieder die Frage nach eventuell unterschiedlichen Transportwegen von dem radioaktiven Label (hier ^{65}Zn) und den durch Degradation freigesetzten Ionen der Nanopartikel. Das Wissen um Zink als ein essentielles Spurenelement ist unumstritten und eine Unterversorgung des Organismus führt zu unspezifischen Mangelercheinungen^{89,128}. Zink ist Bestandteil sehr vieler Enzyme, deren Funktion auf die Anwesenheit des Elements angewiesen ist und es existieren zahlreiche Transporter. Anhand von Studien mit sowohl radioaktiven als auch stabilen Isotopen an Menschen und Nagetieren wurden homöostatische Prozesse bestimmt, Transportwege identifiziert und sogar komplexe Kompartiment-Systeme erstellt (Abbildung 3.19)¹²⁹⁻¹³⁴. Es kann also davon ausgegangen werden, dass von den QDs freigesetztes Zink über die verschiedenen Zinktransporter in den Zinkpool des Organismus eingespeist wird.

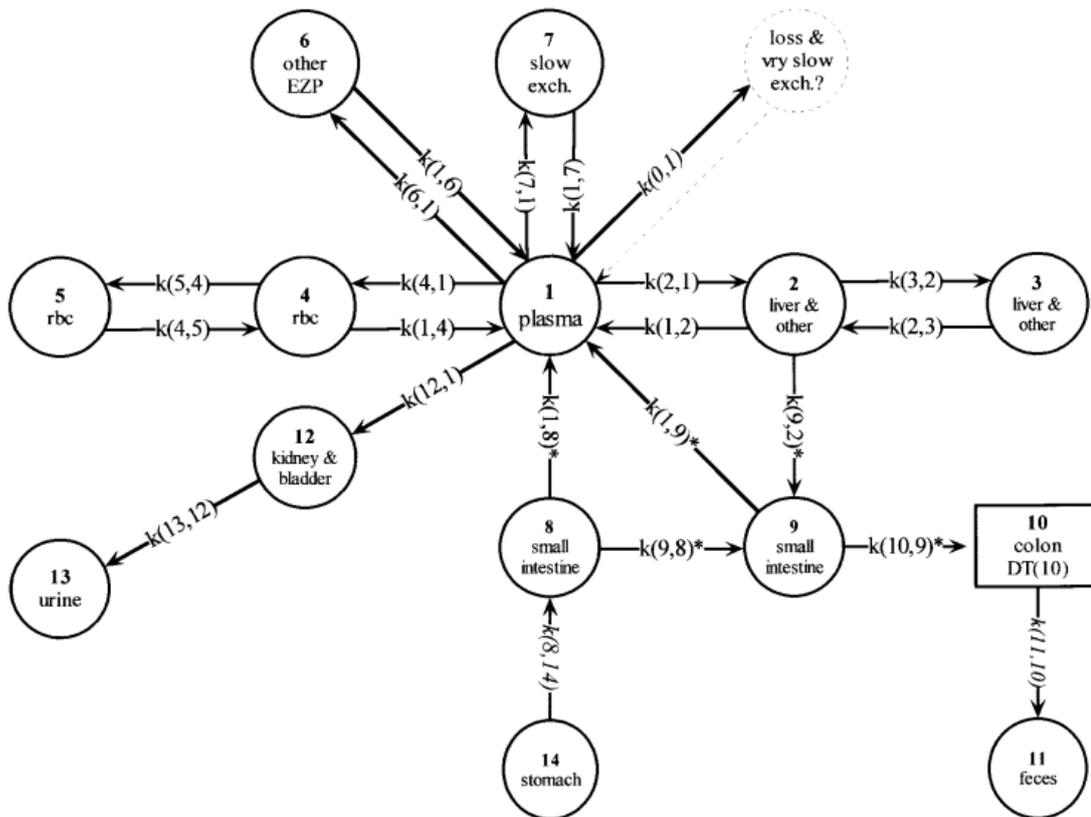


Abbildung 3.19: Kompartiment-Modell zur Veranschaulichung des Zinkmetabolismus von Menschen. Kreise stellen die Kompartimente und Pfeile die Transportwege dar. Die Kompartimente sind willkürlich nummeriert und tragen die physiologische/ anatomische Bezeichnung. Die Pfeile sind gekennzeichnet mit Transfer-Koeffizienten $k(x,y)$, wobei x für das Zielorgan und y für das Ausgangsorgan steht. EZP = *rapidly exchanging zinc pool*, rbc = *red blood cell*. Übernommen aus¹³².

Die Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase findet vor allem über die intestinale Absorption und endogene Exkretion statt¹³⁵. Studien haben zudem gezeigt, dass Patienten mit chronischen Leberschäden erniedrigte Zink-Werte haben¹³⁶. Somit sind der Magen-Darm-Trakt und die Leber wichtige Stoffwechselorgane für Zink und erklären den zunächst hohen prozentualen Anteil der Aktivität 2 h nach Gabe von $^{65}\text{ZnCl}_2$. Unter Berücksichtigung des Organgewichts beinhalten auch Niere und Milz größere Mengen der Aktivität (Abbildung 3.18 A. und B.). Etwa 30 % der injizierten Dosis waren im Kadaver zu finden. Nach vier Wochen hat sich die Organverteilung stark verändert (Abbildung 3.20). Es gibt kein spezifisches Speicherorgan für Zink, daher ist nach vier Wochen eine fast gleichmäßige Verteilung der Aktivität festzustellen. Die höchste spezifische Aktivität besaß der Femur. Die übrigen Organe hatten etwas niedrigere Werte und unterschieden sich nicht viel voneinander. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Untersuchungen aus der Literatur überein. Die höchsten Zinkkonzentrationen im erwachsenen Menschen wurden in Knochen, Muskel und Haut entdeckt, ähnliche Verteilungsmuster wurden auch in Ratten

gefunden^{137,138}. Daher ist eine Anreicherung der ⁶⁵Zn-Aktivität im Tierkörper nicht überraschend (Abbildung 3.20).

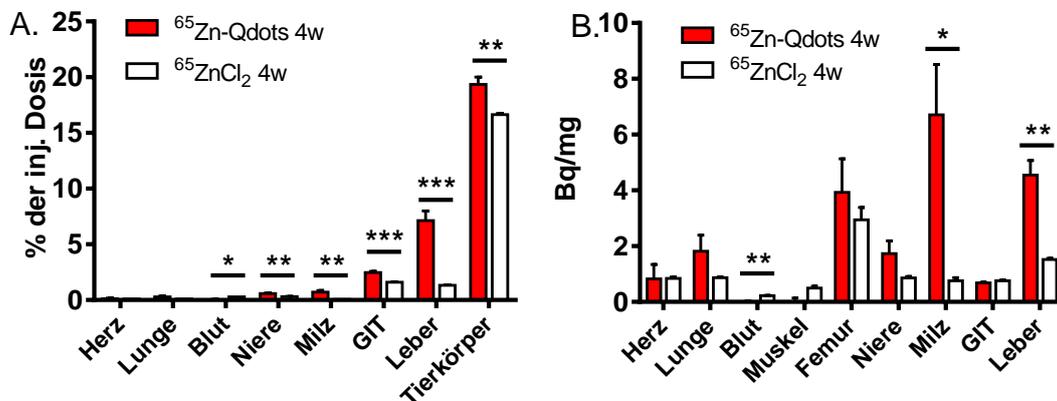


Abbildung 3.20: Organverteilung von ⁶⁵Zn-QDs und ⁶⁵ZnCl₂ nach 4 w. A.) Prozentuale Organverteilung und B.) spezifische Aktivität von Organen 4 w nach Injektion von ⁶⁵Zn-markierten QDs und ⁶⁵ZnCl₂ in die Schwanzvene. GIT = Gastrointestinaltrakt, Mittelwert +/- s.e.m. mit n=4 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

Es zeigte sich außerdem, dass sich die langfristige Organverteilung der Aktivität von ⁶⁵Zn-QDs und ⁶⁵ZnCl₂ einander angenähert hat. Dies spricht für einen partiellen Abbau der ⁶⁵Zn-QDs, auch wenn ein langsames Ausbluten nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Bei der Degradation von CdSe/CdS/⁶⁵ZnS QDs sollte zuerst die äußere Schale angegriffen und ⁶⁵Zn²⁺ freigesetzt werden. Danach erfolgt eine physiologische Verteilung des Elements. Die Hauptaufnahmeorgane der Nanopartikel, Milz und Leber, hatten jedoch nach vier Wochen weiterhin erhöhte Werte. Diese fehlende Angleichung deutet darauf hin, dass noch intakte bzw. nicht oder nur zum Teil degradierte QDs existieren und in dieser Form in Milz und Leber gespeichert wurden. Gleichzeitig spricht dies gegen ein komplettes Ausbluten des ⁶⁵Zn-Labels. Fitzpatrick et al. zeigten, dass Fluoreszenz von QDs, die sie Versuchsmäusen injizierten, sogar über zwei Jahre beobachtbar war. Jedoch war ein *Shift* in der Emission zu erkennen, was sie auf eine langsame Degradation der ZnS-Schale oder den Verlust des Kerns zurückführten¹³⁹.

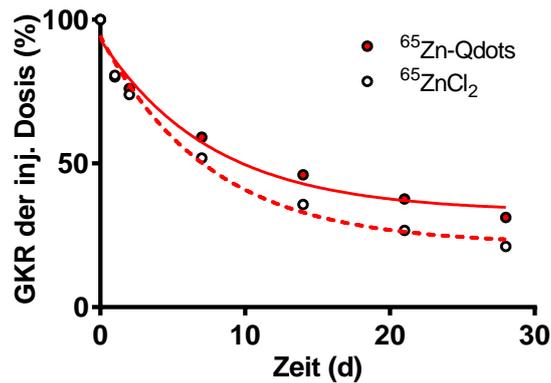


Abbildung 3.21: Ganzkörperretention von ^{65}Zn -QDs bzw. $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach i.v. Injektion.

Abbildung 3.21 zeigt die Ganzkörperretention der Aktivität von ^{65}Zn -QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$. Auf beide Messdaten wurde ein Fit mit einem 3-Kompartiment-System angewandt (siehe Kapitel 3.1.2). Die sich daraus ergebenden Halbwertszeiten sind zwar ähnlich (Tabelle 3.1), trotzdem ist ein Unterschied der Kurven deutlich. Mäuse, die ^{65}Zn -QDs erhielten, zeigten eine verzögerte Exkretion. Dies ist ein Hinweis dafür, dass Zinkionen zunächst durch den langsamen Abbau der Nanokristalle freigesetzt werden mussten, bevor sie den natürlichen Stoffwechselwegen folgten und über die Faeces ausgeschieden wurden.

Tabelle 3.1: Halbwertszeiten von ^{65}Zn -QDs bzw. $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach intravenöser Gabe.

	t_1 (d)	t_2 (d)	t_3 (d)
^{65}Zn -QDs	0.03	6.0	41
$^{65}\text{ZnCl}_2$	0.30	6.7	35

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine radioaktive Markierung von CdSe/CdS/ZnS sowohl mittels radioaktiver Synthese als auch postsynthetischer Inkubation mit ^{65}Zn möglich war. Die Ausbeuten sind im Vergleich zur ^{51}Cr -Markierung von SPIOs jedoch bei beiden Radiomarkierungen gering und die gewonnenen QDs bargen Probleme in der Stabilität des *Labels*. Aufgrund der einfachen Anwendung der postsynthetischen Radiomarkierung wurde für grundlegende partikokinetische Untersuchungen die Austauschmarkierung angewandt. Diese *in vivo* Studien zeigten, dass das Verfahren durchaus dazu geeignet ist. Sie stimmten mit ähnlichen Studien überein. Für zukünftige Untersuchungen wäre es wichtig die Stabilität des *Labels* zu optimieren und zudem ein Verfahren zu entwickeln, in dem nicht nur die äußere Schale, sondern auch der Kern der QDs radiomarkiert wird, wie z.B. Sun et al. es

gezeigt haben. Dies würde näheren Aufschluss darüber geben, in welchem Maße, Kern/Schale/Schale QDs im Körper degradiert werden.

3.2 Zellverteilung von Nanopartikeln

Nach Studien der Organverteilung ist die tiefergehende Untersuchung der Zellverteilung bei der Aufklärung der Verteilung und des Verbleibs von Nanopartikeln die logische Konsequenz. Da die Leber Hauptaufnahmeorgan ist, wurde sich in der Untersuchung der Zellverteilung auf dieses Organ konzentriert.

Die Leber ist verantwortlich für die meisten Stoffwechselfvorgänge des Organismus, ist Speicherorgan für Vitamine, Spurenelemente und Glykogen und spielt selbst in der Immunantwort eine wichtige Rolle. Die verschiedenen Funktionen werden von unterschiedlichen Zelltypen ausgeführt. Jede Minute werden 30 % des gesamten Blutvolumens durch die Sinusoide der Leber transportiert und somit in Kontakt mit den Zellen gebracht¹⁴⁰. Die Sinusoide sind ausgekleidet mit fenestriertem Endothel (LSEC, *liver sinusoidal endothelial cell*), dazwischen sind auch ortsansässige Makrophagen, die Kupffer-Zellen (KC, *Kupffer cell*) zu finden (Abbildung 3.22). Anders als viele andere Endothelzellen, kleiden LSEC nicht nur die Sinusoide aus, sie besitzen auch endozytotische Fähigkeiten. LSEC tragen drei Hauptgruppen von endozytotischen Rezeptoren, darunter *Scavenger* Rezeptoren, welche negativ geladene Makromoleküle binden¹⁴¹. Somit gehören neben den KC auch LSEC zum MPS der Leber. Hinter den Endothel- bzw. Kupffer-Zellen befindet sich der Disse-Raum, gefolgt von aneinandergereihten Hepatozyten. Hepatozyten machen über zwei Drittel der gesamten Zellzahl der Leber aus. den Hauptteil des Nicht-Parenchyms machen LSEC (~50 %), KC (20 %) und Lymphozyten (~25 %) aus.

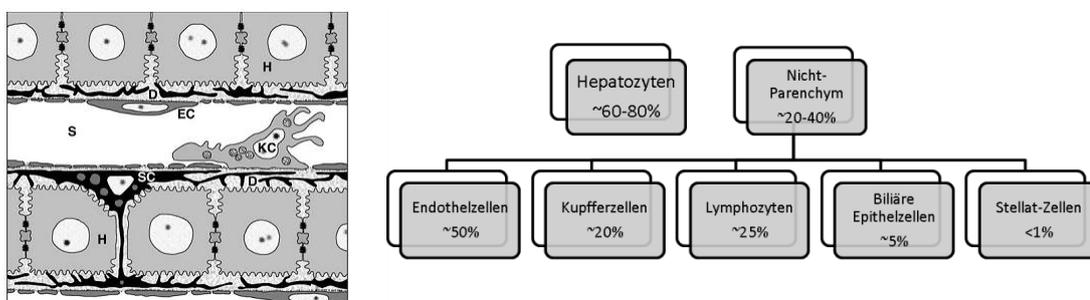


Abbildung 3.22: Struktur der Leber und Aufteilung der Zellzahlen. Übernommen aus ^{142,143}.

3.2.1 Untersuchung der Zellverteilung mit Hilfe von radiomarkierten Nanopartikeln

Es wird beschrieben, dass Nanopartikel in Abhängigkeit ihrer Größe, Form und allgemeinen Oberflächenbeschaffenheit wie z.B. der Ladung aufgenommen werden¹⁴⁴. Mit dem Verpacken der in dieser Arbeit verwendeten SPIOs und QDs in das amphiphile Polymer PMAOD, weisen diese Partikel dieselbe Oberfläche und negative Ladung auf und, wie anhand der SEC der polymerverpackten SPIOs und QDs zu erkennen ist, auch ähnliche Größen (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.12). Daher wurde angenommen, dass diese Partikel nach einem sehr ähnlichen Muster aufgenommen und verteilt werden. Beispielsweise untersuchte Freund die Zellverteilung der mit PMAOD verpackten SPIOs unter anderem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie⁸⁴. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Lebern, welche 2 h nach i.v. Gabe entnommen wurden, waren SPIOs in endozytotischen Vesikeln von Endothel- und Kupffer-Zellen zu finden. Sie bestätigte diese Befunde mit intravitalkroskopische Aufnahmen, für die sie in PMAOD verpackte QDs verwendete. Andere Arbeiten zeigten ebenfalls eine Verteilung von QDs (wasserlöslich durch Ligandenaustausch mit Mercaptoundecansäure und Konjugation mit Proteinen), die der von polymerumhüllten SPIOs, die hier verwendet wurden, ähnlich ist¹⁴⁵. In Hepatozyten waren in Transmissionselektronenmikroskopie -Bildern von Lebern 2 h nach Injektion keine SPIOs zu finden, Freund diskutierte daher eine eher geringe Beteiligung in der Aufnahme von Partikeln. Die Beteiligung von Hepatozyten an der Aufnahme und Prozessierung von Partikeln und deren Degradationsprodukten sollte dennoch näher untersucht werden

In Freunds Arbeit war nach der i.v. Gabe von ⁵⁹Fe-radiomarkierten Nanopartikeln Aktivität in den Faeces zu messen. Der Verlust kann auf abgeschilferte ⁵⁹Fe-haltige Epithelzellen in den Faeces zurückgeführt werden, denn nach der heutigen Vorstellung wird die Homöostase von Eisen primär über die intestinale Aufnahme gesteuert und es wird davon ausgegangen, dass keine kontrollierte Ausscheidung über die Leber oder die Niere stattfindet¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Bei einer Vorbehandlung mit Clodronat-Liposomen, was zu einer vorübergehenden Depletion von Kupffer-Zellen führt, war jedoch eine zu Beginn beschleunigte Ausscheidung der ⁵⁹Fe-Aktivität zu verzeichnen (Abbildung 3.23 A.). Diese Beobachtung ließ die Frage aufkommen, ob bei einer hohen Eisenbelastung der Zellen eventuell doch ein kontrollierter Ausscheidungsweg von Eisen über die Faeces existiert. Dieser Mechanismus schließt Hepatozyten mit ein, da die Ausscheidung von Stoffen aus der Leber über die Faeces wohl ausschließlich über die Galle, welche ihrerseits ausschließlich über die

Hepatozyten sezerniert wird, stattfindet. Dieser Verdacht sollte näher untersucht werden. Dazu wurden Versuchsmäusen ^{59}Fe -radiomarkierte SPIOs in die Schwanzvene injiziert und nach vier Stunden die Organe entnommen. Einige Tiere wurden mit Clodronat-Liposomen vorbehandelt, da in diesen Versuchstieren eine beschleunigte Ausscheidung zu beobachten war⁸⁴. Bei der Untersuchung der Organverteilung wurde ein besonderes Augenmerk auf die Galle in der Gallenblase gelegt (Abbildung 3.23 B.). In keiner der beiden Gruppen war Aktivität in der Galle zu messen und somit auch kein Unterschied feststellbar. Es ist möglich, dass keine Ausscheidung über die Galle stattfindet und dass die messbare Aktivität in den Faeces ausschließlich von abgeschilferten ^{59}Fe -haltigen Epithelzellen stammt. Es ist jedoch auch eine Frage der Messgenauigkeit, inwieweit sich durch diesen Versuch eine Ausscheidung von ^{59}Fe aus SPIOs in die Galle ausschließen lässt. Es besteht die Möglichkeit, dass sowohl die Ausscheidungsrate als auch das Volumen der Gallenflüssigkeit in der Gallenblase von Mäusen ($\sim 20 \mu\text{L}$) zu gering ist um einen messbaren Wert zu erhalten.

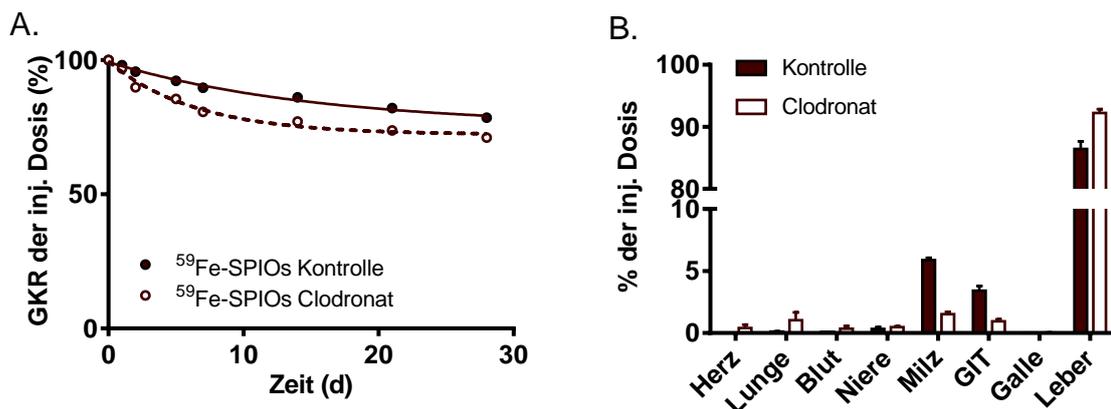


Abbildung 3.23: Ganzkörperretention und Prozentuale Organverteilung von ^{59}Fe nach Gabe von ^{59}Fe -SPIOs bei mit Clodronat behandelten und Kontrollmäusen. A.) ^{59}Fe -Ganzkörperretention von mit Clodronat behandelten und Kontrollmäusen. B.) Organverteilung von ^{59}Fe -SPIOs 4 h nach i.v. Injektion. GIT = Gastrointestinaltrakt, Mittelwert +/- s.e.m. mit n=3

Die Beteiligung von Hepatozyten an der Partikelaufnahme und Prozessierung sollte in weiteren Versuchen analysiert werden. Es kommt prinzipiell eine direkte Aufnahme in Frage, da kleinere Partikel ($<100 \text{ nm}$) das fenestrierte Endothel passieren können und so Zugang zu den Hepatozyten haben. Es ist aber auch möglich, dass das ^{59}Fe durch einen Abbau der ^{59}Fe -SPIOs durch Kupfer-Zellen und darauffolgenden Transport des Eisens in die Hepatozyten aufgenommen wird. Um dies zu prüfen, wurden Mäusen ^{59}Fe -SPIOs i.v. injiziert und 2 h bzw. 24 h nach Gabe Hepatozyten aus den Lebern isoliert. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 3.24 dargestellt.

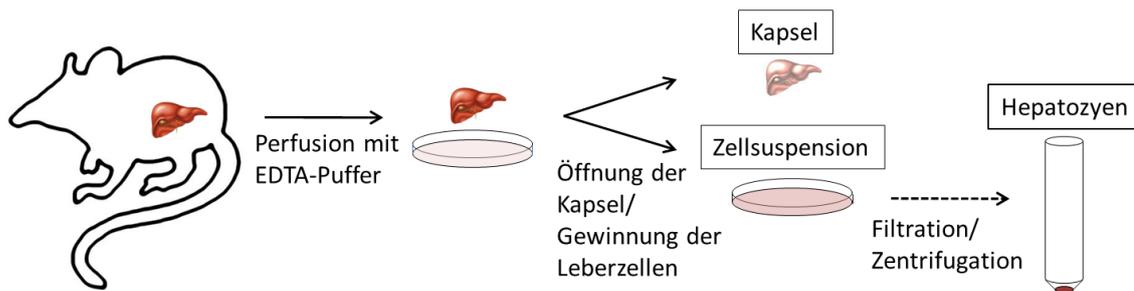


Abbildung 3.24 Präparation von murinen, primären Hepatozyten

Betrachtet man die Verteilung der Aktivität zwischen den Bestandteilen der Leber, fällt auf, dass nur ein Bruchteil der Aktivität in der Fraktion mit vitalen Hepatozyten wiederzufinden war (Abbildung 3.25 A.). Sohlenius-Sternbeck bestimmte die Gesamtzahl an Hepatozyten in verschiedenen Säugern mittels Messungen der Proteinkonzentration¹⁴⁹. Für die der Maus errechnete sie mittels dieser Methode $1,35 \cdot 10^8$ Hepatozyten/ Gramm. Eine durchschnittliche Ausbeute von $\sim 7,5 \cdot 10^6$ Hepatozyten pro Leber mit der hier angewandten Isolationsmethode ist für die meisten Zellexperimente völlig ausreichend, entspricht aber nur etwa 5 % der Gesamtheptozyten. Hochgerechnet wäre somit etwa die Hälfte der Aktivität in der Leber in den Hepatozyten wiederzufinden, was einen Widerspruch zu den bisherigen Befunden darstellt. Wenn etwa die Hälfte der Aktivität in Hepatozyten wiederzufinden ist, hätte man bei einer direkten Partikelaufnahme auch Nanopartikel in TEM-Bildern sehen müssen. Dieses Ergebnis spricht eher für die Aufnahme von freigesetztem Eisen und gegen die Aufnahme intakter Partikel. Die Berechnungen sind jedoch sehr theoretisch und in Anbetracht der Tatsache, dass dieser Zelltyp bis 80% der Leberzellen darstellt, ist dies immer noch ein relativ geringer Anteil.

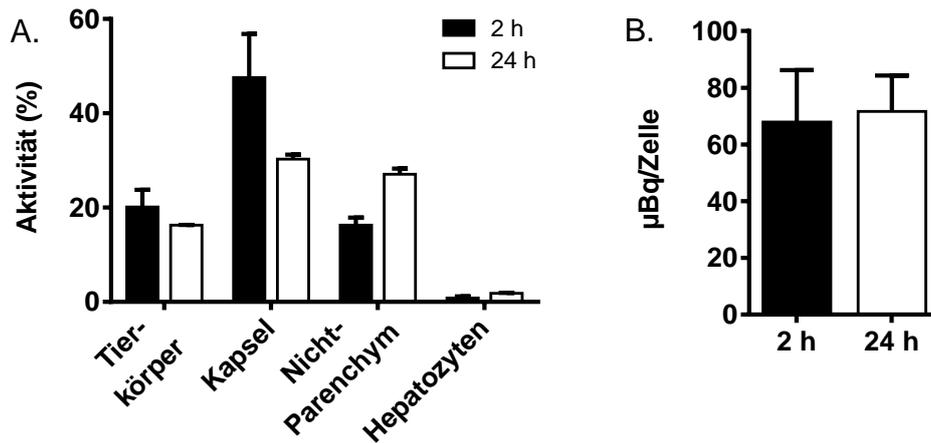


Abbildung 3.25: Verteilung der ^{59}Fe -Aktivität innerhalb der Leber nach Gabe polymerumhüllter SPIOs. A.) Verteilung der ^{59}Fe -Aktivität zwischen den Bestandteilen der Leber nach der Präparation. B.) Aktivität auf Zellzahl normiert. Mittelwert \pm s.e.m. mit $n=2$

Normiert auf die Zellzahl war kein Unterschied der spezifischen Aktivität zwischen der Isolation 2 h und 24 h nach Injektion zu erkennen (Abbildung 3.25 B.). Dieses Ergebnis könnte zum einen gegen einen Transport zwischen den Zellen und für eine Aufnahme von Nanopartikeln in Hepatozyten sprechen, da man ansonsten im Zeitverlauf durch einen gesteigerten Transport freier ^{59}Fe -Ionen zum späteren Zeitpunkt auch eine höhere Aktivität in den Hepatozyten erwartet hätte. Andererseits kommt auch eine sehr rasche Prozessierung der Partikel in KC und darauffolgender Transport von freigesetztem Eisen und ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht im Transport in Frage. Den Stabilitätsuntersuchungen von ^{51}Cr -SPIOs nach zu urteilen (Abbildung 3.4) wäre das denkbar. Die Frage könnte weiter abgeklärt werden, indem man für die Isolation von Hepatozyten kürzere Verweilzeiten, wie z.B. 10 oder 30 min, nach i.v. Injektion wählt oder ^{51}Cr -SPIOs verwendet, unter der Annahme, dass zu diesen Zeiten noch kein Abbau von SPIOs stattfindet bzw. kein Transport von Chrom aus KC und LSEC existiert. Da aber die Experimente die bisherigen Erkenntnisse unterstützen, dass Endothel- und Kupfer-Zellen eine wesentlich größere Rolle in der Aufnahme der polymerverpackten SPIOs bzw. QDs spielen, wurde in der weiteren Arbeit der Fokus auf die Verteilung auf das Nicht-Parenchym gelegt.

3.2.2 Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Zellverteilung

Die in der Literatur beschriebene Aufnahme von polymer- oder dextranumhüllten SPIOs bzw. QDs ins MPS der Leber, also in LSEC und KC, sollte zunächst bestätigt werden. Dazu wurden Versuchstieren polymerverpackte QDs injiziert und 2 h nach Gabe die Leber perfundiert und

das Organ für die Kryoschnitttechnik vorbereitet. Die Kryoschnitte wurden auf LSEC und KC gefärbt (Abbildung 3.26).

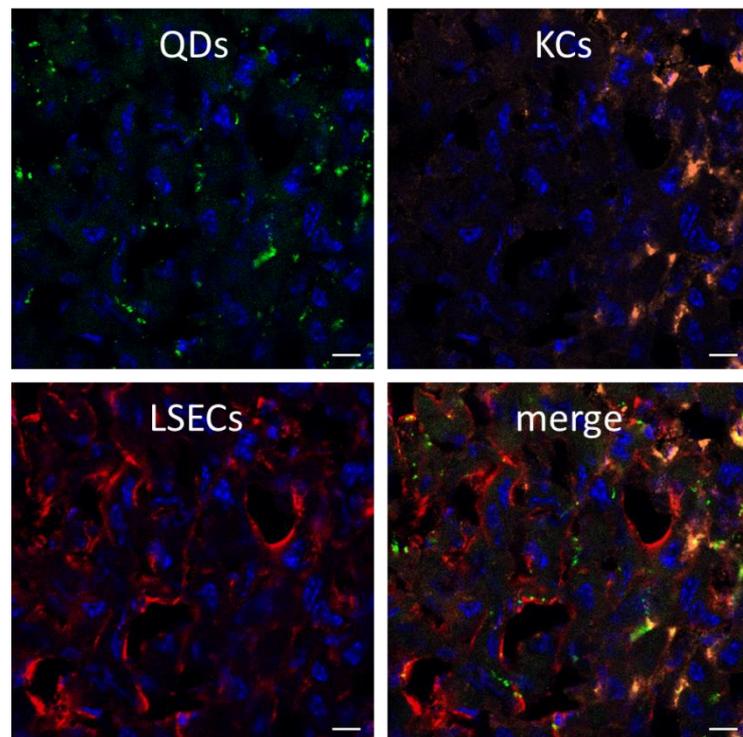


Abbildung 3.26: Konfokale Mikroskopie eines Kryoschnitts einer Mausleber 2 h nach i.v. Injektion von polymerverpackten QDs. Der Zellkern erscheint durch einen DNA-Farbstoff blau. Immunhistochemische Färbungen von Kupfer-Zellen (KCs, anti-CD68) und Sinusoidalen Endothelzellen (LSEC, anti-CD31) wurden durchgeführt. Die Nanopartikel kolokalisieren sowohl mit KCs als auch mit LSECs. Maßstab: 10 μ m.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten die vermutete Kolokalisation von QDs und LSEC und KC. Eine Kolokalisation von QDs mit Hepatozyten war nicht zu erkennen. Es ist möglich, dass die höhere Zellzahl und Größe der Hepatozyten zu einer Verdünnung der Partikel und somit schwächeren Fluoreszenz führt und die QDs hier nicht punktuell wie bei LSEC und KC vorliegen. Man könnte dieses Ergebnis aber auch so interpretieren, dass keine direkte Partikelaufnahme stattfindet.

Weiterhin von Interesse ist eine quantitative Beschreibung der Verteilung der polymer-verpackten Partikel auf LSEC und KC. Um eine möglichst genaue Aussage über die Mengenverteilung der Partikel zu erhalten wurde eine neue Methode angewandt. Sie bedient sich einer positiven Selektion von magnetisch markierten Zellen mittels Magnetsäulen (Miltenyi Biotec). In einem Vorversuch sollte das System getestet werden. Dafür wurden murine Makrophagen (J774) für 4 h mit polymerverpackten SPIOs inkubiert ($\approx 0,14$ mM Eisen) und die geernteten Zellen auf die magnetisierte Säule gegeben. Kontrollzellen

wechselwirkten nicht mit der Säule im Magnetfeld und liefen ungehindert durch sie durch (Abbildung 3.27). Daher waren sie zum größten Teil im Durchfluss enthalten; stellvertretend für die Zellzahl wird hier die Proteinmenge angegeben. Eine Messung des Eisengehalts mittels AAS zeigte zudem niedrige Eisenwerte. Zellen, welche magnetisch markiert sind, werden vom Magneten aufgehalten und in einem zweiten Schritt mit einem Stempel von der entmagnetisierten Säule eluiert. Mit SPIOs inkubierte Zellen waren vor allem im Eluat wiederzufinden. Die Wechselwirkung mit dem Magneten und ein zudem hoher Eisengehalt sind auf die Endozytose von Eisenoxidpartikeln zurückzuführen. Mit diesem Experiment galt eine positive Selektion von SPIO-internalisierenden Zellen als bewiesen.

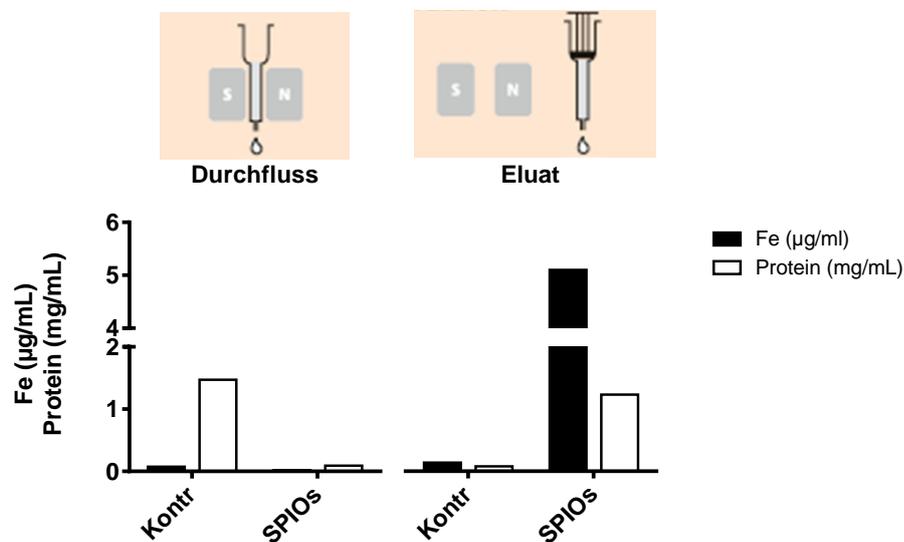


Abbildung 3.27: Isolation von SPIO-markierten Zellen in einem Magnetfeld. Nach Inkubation von J774-Zellen mit SPIOs bzw. Vollmedium (Kontrolle) wurden SPIO-endozytierende Zellen mithilfe einer magnetisierten Säule separiert, was durch den Nachweis einer hohen Eisen- und Proteinkonzentration im Eluat gezeigt werden konnte.

Für eine quantitative Aussage über die Zellverteilung der hier verwendeten Nanopartikel wurden Mäusen diese intravenös injiziert und nach 2 h die Leber nach Collagenase-Perfusion zur Präparation nicht-parenchymaler Zellen entnommen (Abbildung 3.28 A.). Nach verschiedenen Zentrifugationsschritten erhält man eine Phase mit nicht-parenchymalen Zellen wie LSEC und KC, die auf eine Magnetsäule gegeben wurde, um die SPIO-internalisierenden Zellen zu isolieren.

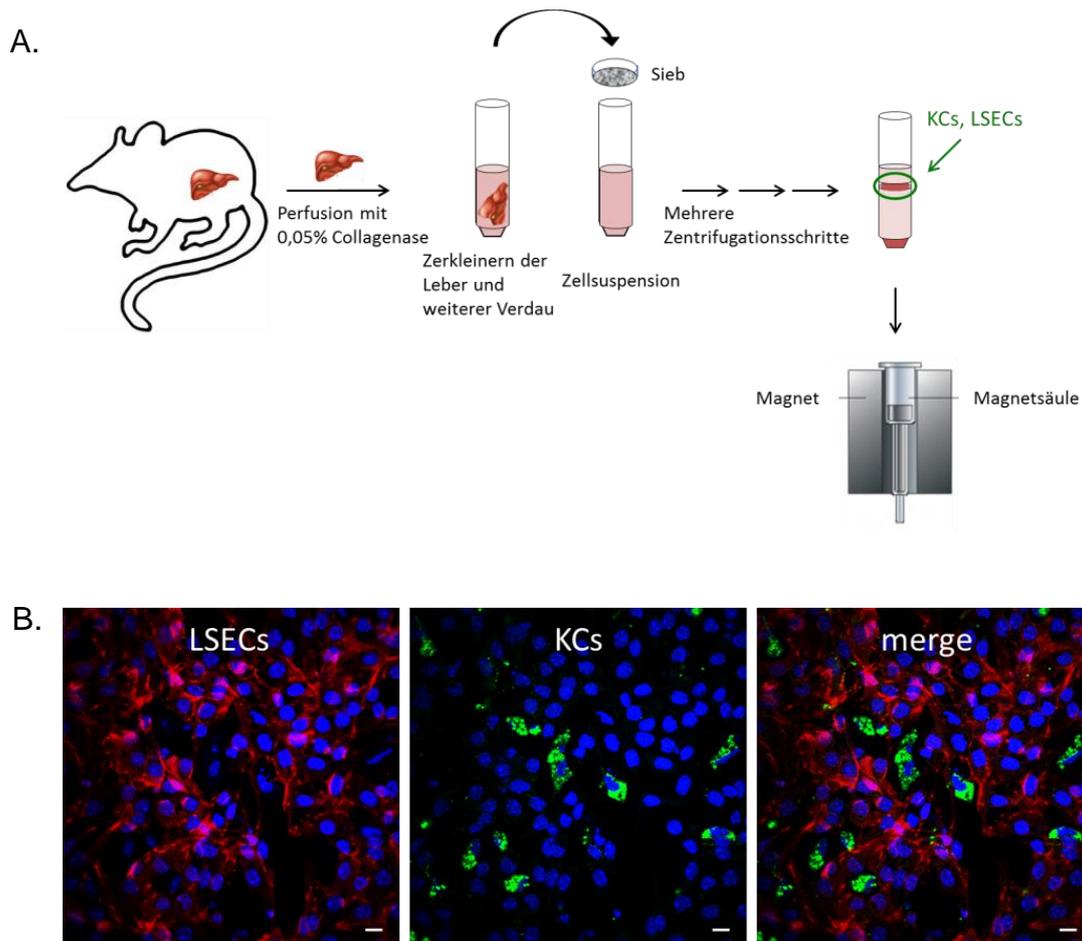


Abbildung 3.28: Isolation nicht-parenchymaler Zellen nach Gabe von polymerumhüllten SPIOs. A.) Präparation von primären nicht-parenchymalen Leberzellen. B.) Immuncytochemische Färbung der so gewonnenen Zellen. Der Zellkern erscheint durch einen DNA-Farbstoff blau. Sinusoidale Endothelzellen (LSEC) wurden über CD31 und Kupfer-Zellen (KCs) über CD68 gefärbt. Maßstab: 10 μ m.

Die so gewonnenen Zellen wurden ausgesät und über Nacht ruhen gelassen. Eine Fixierung der Zellen und anschließende immuncytochemische Färbung der LSEC und KC wurde durchgeführt (Abbildung 3.28 B.). Die Färbung zeigt, dass viele Endothelzellen isoliert wurden und wenige Kupfer-Zellen. Aufgrund einer natürlichen Überzahl an LSEC gegenüber KC in der Leber überrascht das nicht. Wie bereits erwähnt liegt das Verhältnis der Zellzahlen von KC und LSEC bei 1 : 2,5. Um eine genauere Aussage über die Zellverteilung zu bekommen, wurden die über die Magnetsäule isolierten Zellen via Durchflusszytometrie untersucht (Tabelle 3.2). Als Kontrolle diente das gesamte Nicht-Parenchym (die Phase, die im nächsten Schritt auf die Magnetsäule gegeben wird) einer Maus, die keine SPIOs erhielt. LSEC und KC wurden über VE-Cadherin bzw. F4/80 gekennzeichnet. Die Zellverteilung im Nicht-Parenchym betrug ca. 59 % und 8 % für LSEC und KC. Diese Werte zeigen Ähnlichkeit mit den von Mackay berichteten 50 und 20 %¹⁴³. Das Verhältnis ist jedoch mit 7 : 1 zugunsten der

LSEC erhöht. Die über die Magnetsäule separierten Zellen bestehen zu 72 % aus LSEC, KC tragen etwas über 8 % bei. Das könnte bedeuten, dass LSEC geringfügig mehr SPIOs aufnehmen, nicht nur weil sie zahlenmäßig überwiegend, sondern offensichtlich auch eine etwas höhere Affinität für die Partikelaufnahme haben.

Tabelle 3.2: Quantitative Verteilung von polymerverpackten SPIOs auf LSEC und KC.

	LSEC	KC
Kontrolle	59,1 %	8,3 %
SPIOs	72,0 %	8,6 %

Um die Aufnahme und darauffolgende Prozessierung von polymerverpackten Partikeln näher zu untersuchen, wurde ein weiteres Zellexperiment durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit mit den *in vivo* Daten wurde eine murine Makrophagen-Zelllinie verwendet. Diese wurde für 2 h mit polymerverpackten QDs inkubiert. Nach Entfernen der QDs wurde ein Teil der Zellen direkt fixiert. Ein anderer Teil wurde weiterkultiviert und erst nach 24 h fixiert, um einen eventuellen Abbau der aufgenommenen QDs durch Abnahme oder Verschwinden der Fluoreszenz festzustellen. Im konfokalen Mikroskop zeigten die Zellen durch Aufnahme der QDs punktuell Fluoreszenz (Abbildung 3.29) und eine immunocytochemische Färbung der Lysosomen durch LAMP-1 zeigte, dass QDs mit diesen Organellen kolokalisieren. Die Akkumulation von QDs, oder Nanopartikeln im Allgemeinen, in Lysosomen wurde auch schon in früheren Arbeiten beschrieben¹⁵⁰. Eine quantitative Aussage über die Abnahme der Lumineszenz mit Verweilen der QDs in den Lysosomen lässt sich hier nicht machen, da eine Intensitätsmessung der Fluoreszenz nicht durchgeführt wurde. Sehr wohl ist aber bereits mit dem bloßen Auge zu erkennen, dass auch nach 24 h noch Fluoreszenz von QDs zu sehen ist. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass zu diesem Zeitpunkt noch kein gravierender Abbau stattfand. Eine Beobachtung über Tage oder Wochen wäre sinnvoll, dafür sind Zellkulturen aber ungeeignet.

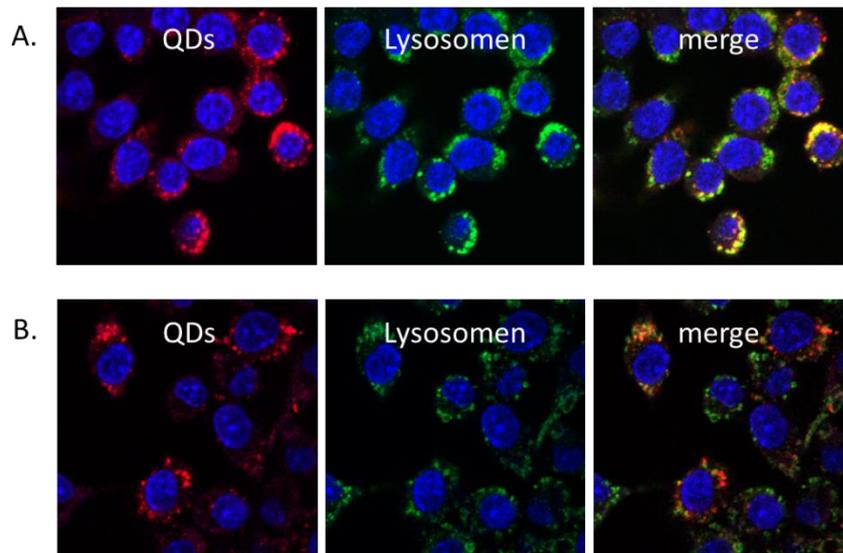


Abbildung 3.29: Kolokalisation von QDs und Lysosomen. J774-Zellen wurden für 2 h mit QDs inkubiert und direkt im Anschluss (A.) oder 24 h später fixiert (B.). Die immunocytochemische Färbung von Lysosomen fand über einen Antikörper gegen LAMP1 statt.

Daher wurden wiederholt Kryoschnitte der Leber von Mäusen angefertigt; die Mäuse erhielten zwölf Wochen zuvor polymerverpackte QDs per i.v. Injektion. In diesen Lebern war keine Fluoreszenz mehr detektierbar, was auf eine Prozessierung und einen Abbau der Partikel und einen damit einhergehenden Verlust der Fluoreszenz hinweist. Diese Beobachtung unterstützt die hier vorgestellten Ergebnisse der partikokinetischen Untersuchungen und spricht für einen kontinuierlichen Abbau der verwendeten QDs. In der Literatur gibt es zum Thema Verbleib und Abbau verschiedener und verschieden umhüllter Quantum Dots Studien mit unterschiedlichen Resultaten.

Es gibt Gruppen, welche Polyethylenglykol (PEG) - umhüllte CdE/ZnS QDs (E = Se, Te) einsetzen und noch nach 28 Tagen bzw. zwei Jahren Fluoreszenz in Organen von Versuchstieren sehen konnten, was für einen sehr langsamen Abbau spricht^{139,151}. Dies entspricht der Vorstellung, die man von QDs hatte als diese Ende der 1990er als vielversprechende Fluorophore für die biochemische Anwendung entdeckt wurden, da sie anders als fluoreszierende Moleküle eine hohe Photostabilität aufwiesen. Hanaki et al. berichteten 2003 über Quantum Dot/ Albumin Komplexe als stabile Endosom Marker, deren Fluoreszenz über fünf Tage in Zellen detektierbar war¹⁵². Eine Abnahme der Fluoreszenz ließ sich bis dahin auf die Zellteilung zurückführen. 2006 prüften Boldt et al. die Stabilität von, mittels Präzipitation hergestellten, Thiol-bedeckten CdTe QDs in biochemischen Puffern und zeigten, dass niedrige pH-Werte zu einem Verlust der Fluoreszenz führten und erklärten dies durch einen Abbau der Partikel¹⁵³. Pi et al. konnten eine Fluoreszenzabnahme in ihren Experimenten mit murinen embryonalen Stammzellen schon in den ersten 24 h messen, die sie auf einen

Abbau oder eine Exozytose der QDs zurückführten. Sie verwendeten für ihre Experimente CdE/ZnS QDs mit einer Hülle aus einem amphiphilen Polymer¹⁵⁴. Fluoreszenz ist mit Sicherheit ein gutes Merkmal für intakte QDs, lässt sich aber schlecht quantifizieren. In einigen Verteilungsstudien wurde zur Quantifizierung von QDs in Organen der Cd-Gehalt mittels ICP-MS gemessen. Su et al. ermittelten z.B. mit dieser Methode den Cd-Gehalt der Organe für Kurz- und Langzeitverteilungen von CdTe QDs¹⁵⁵. Auch wenn eine Umverteilung des Cadmiums einen Abbau befürwortet, so lässt dies genaugenommen keinerlei Rückschlüsse auf Unversehrtheit der Partikel zu, sondern lediglich auf den Verbleib der Bestandteile. Aus diesem Grund ermittelten Liu et al. gleichzeitig den Te-Gehalt in den Organen nach Gabe von Thiol-bedeckten CdTe/ZnS QDs¹⁵⁶. Ausgehend von ihren Ergebnissen sprechen sie von einem eher schnellen Abbau von QDs, der schon innerhalb weniger Stunden beginnt und den sie durch Messung des Cd:Te Verhältnisses in verschiedenen Organen feststellten.

Mit den hier gewonnenen Ergebnissen ist von einem mäßig schnellen Abbau von polymerumhüllten CdSe/CdS/ZnS QDs auszugehen, der sich sowohl in einer Umverteilung der Bestandteile in den Organen als auch in einem Verlust der Fluoreszenz manifestiert (Abbildung 3.20 und Kapitel 3.2.2). Polymerumhüllte SPIOs scheinen einem zügigen Abbau unterworfen. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche zeugen von einer raschen Degradation der Hülle und des Kerns (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.25). Beide Arten von Nanopartikeln werden vor allem von den Endothel- und Kupffer-Zellen der Leber aufgenommen. Eine direkte Partikelaufnahme in Hepatozyten konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, sie scheinen in der Aufnahme von Nanopartikeln kaum oder gar nicht beteiligt zu sein.

3.3 Funktionalisierung von Nanopartikeln

3.3.1 Oberflächenmodifikation mittels Kopplung eines spezifischen Liganden

Nanopartikel jeglicher Art können abhängig von ihrer Anwendung modifiziert werden. Eine einfache und effektive Methode Nanopartikel nachträglich zu verändern ist die Oberflächenmodifizierung. Die Oberflächenbeschaffenheit ist maßgeblich an der Interaktion des Partikels mit seiner biologischen Umgebung beteiligt und bestimmt somit sein Schicksal^{157,158}. Dieser Umstand führte dazu, dass in den vergangenen Jahren intensiv daran geforscht wurde, wie Nanopartikel gezielt an einen bestimmten Ort im Körper gebracht werden

können. Besonders im Bereich der Krebsforschung hofft man auf einen Nanopartikel, welcher präzise Tumorzellen kennzeichnen und im besten Fall gleich ein Therapeutikum mitliefern kann. Die bis heute entwickelten Systeme erfüllen in klinischen Studien jedoch nicht die großen Erwartungen, die aus vorausgegangenen vielversprechenden *in vitro*- und Tierversuchen hervorgehen¹⁵⁹.

Eine Oberflächenmodifikation eines Nanopartikels und eine damit gewünschte veränderte Aufnahme war auch Teilziel dieser Arbeit. Aufgabe war es die hier verwendeten Nanopartikel so zu verändern, dass sie innerhalb des Hauptaufnahmeorgans, der Leber, vermehrt von Hepatozyten, statt von LSEC und KC aufgenommen werden. Hepatozyten spielen eine zentrale Rolle in der Eisen Homeöostase und gehören, neben heranreifenden Erythrozyten und proliferierenden Zellen, zu den Zellen mit einer besonders hohen Expression des Transferrin Rezeptors 1⁹⁵. Nebenbei ist auch der Transferrin Rezeptor 2 hauptsächlich auf der Zellmembran der Hepatozyten exprimiert⁹⁶. Die Idee ist, dass durch Kopplung von Transferrin an den Nanopartikel eine spezifische Aufnahme mittels Rezeptor-Ligand System durch Hepatozyten stattfindet und somit z.B. eine erhöhte Aufnahme von QDs sichtbar gemacht werden kann.

Für die Versuche wurde Transferrin kovalent an die polymerumhüllten QDs bzw. SPIOs gebunden. Die Bindung erfolgt über eine Aminogruppe des Proteins und einer Carboxylgruppe des den Partikel umgebenden Polymers¹⁰⁵. Mit Hilfe von *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) entsteht eine Amidbindung (Abbildung 3.30). Nach erfolgter Kopplung wird überschüssiges Transferrin mit Hilfe eines 100 kDa Zentrifugationsfilters entfernt.

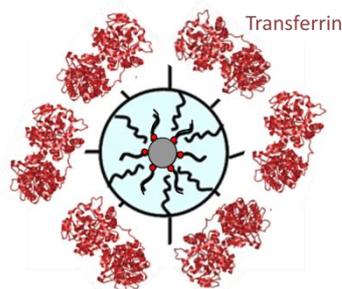


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung eines funktionalisierten SPIOs. Transferrin wurde kovalent an die Polymerhülle des SPIOs gekoppelt.

Die so gekoppelten SPIOs und QDs können über eine Agarosegelelektrophorese und SEC charakterisiert werden (Abbildung 3.31). Die SPIOs sind anhand ihrer bräunlichen Färbung gut im Gel zu erkennen. Gekoppelte Tf-SPIOs laufen im Vergleich zu den ungekoppelten SPIOs etwas

langsamer, was durch die Zunahme des hydrodynamischen Volumens durch Anlagerung der Proteine zu erklären ist. Dasselbe gilt für gekoppelte und ungekoppelte QDs, welche im Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht werden können (Abbildung 3.31 A. und B.). Die Größenzunahme ist auch gut in den SECs durch Verschiebung des Peaks zu früheren Zeiten zu sehen (Abbildung 3.31 C. und D.). Allerdings wird auch der Peak bei Minute 15, der auf agglomerierte Partikel hinweist, größer. Dies ist ein Nebeneffekt durch die mehrmalige Zentrifugation. Durch eine Anfärbung des Proteins mit Coomassie-Brilliant-Blau ist zudem eine Blaufärbung der gekoppelten Nanopartikel möglich und zeigt somit, dass tatsächlich Protein mit den Nanopartikeln kolokalisiert und nicht nur eine Agglomeration durch die wiederholte Zentrifugation bei der Aufreinigung mittels Zentrifugationsfilter stattfand.

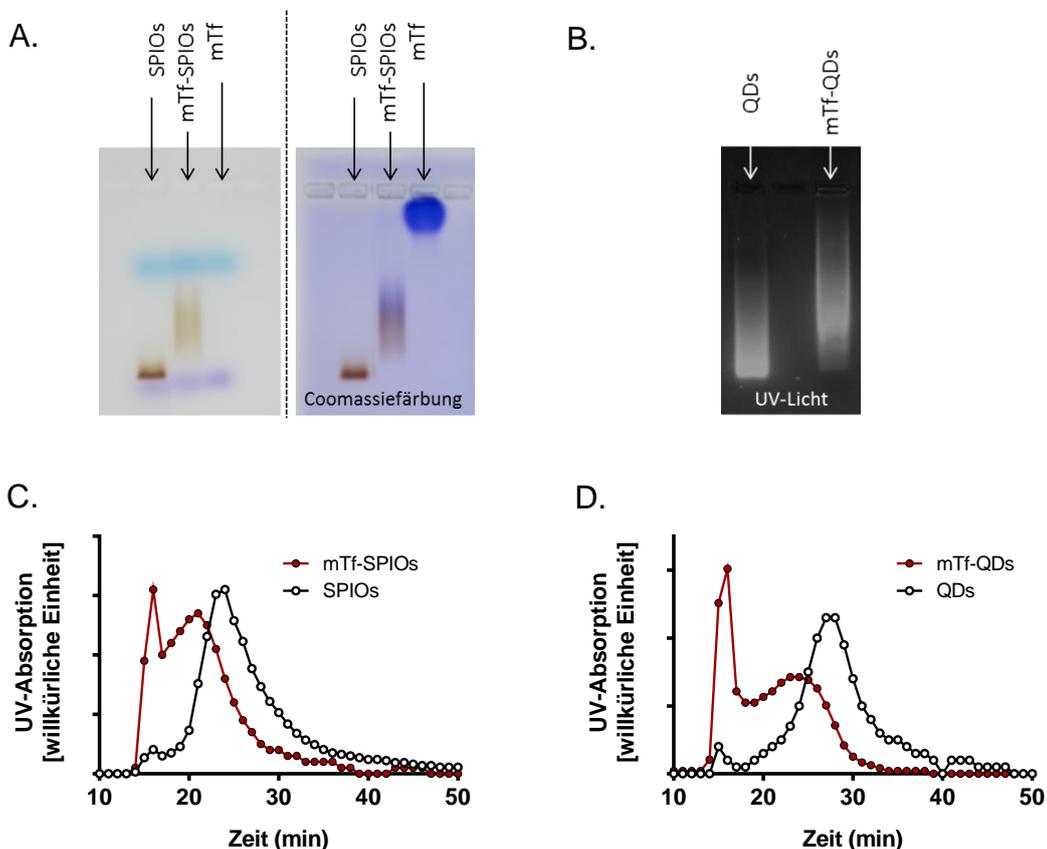


Abbildung 3.31: Agarosegele und SEC von gekoppelten Nanopartikeln. A.) Auftrennung von ungekoppelten und mTf-gekoppelten SPIOs, sowie freiem mTf im Agarosegel. Rechts zeigt die Färbung von Protein mit Coomassie. B.) Agarosegel von gekoppelten und ungekoppelten mTf-QDs im UV-Licht. C.) SEC von SPIOs und mTf-SPIOs. D.) SEC von QDs und mTf-QDs.

Um eine gesteigerte Aufnahme von QDs durch die Oberflächenfunktionalisierung mit Transferrin in Hepatozyten zu testen wurden funktionalisierte QDs Versuchsmäusen i.v. injiziert. Für die Überprüfung einer

spezifischen Aufnahme wurde zum einen murines Transferrin und zum anderen humanes Transferrin für die Kopplung verwendet. Um zusätzlich die Lokalisation des Transferrins im Gewebe zu ermöglichen waren sowohl an das murine als auch an das humane Transferrin für die Detektion unter dem Mikroskop Fluorophore gekoppelt. Die perfundierten Lebern wurden 2 h nach Gabe der Nanopartikel entnommen und mit Hilfe eines Kryostaten für die histologische Untersuchung geschnitten.

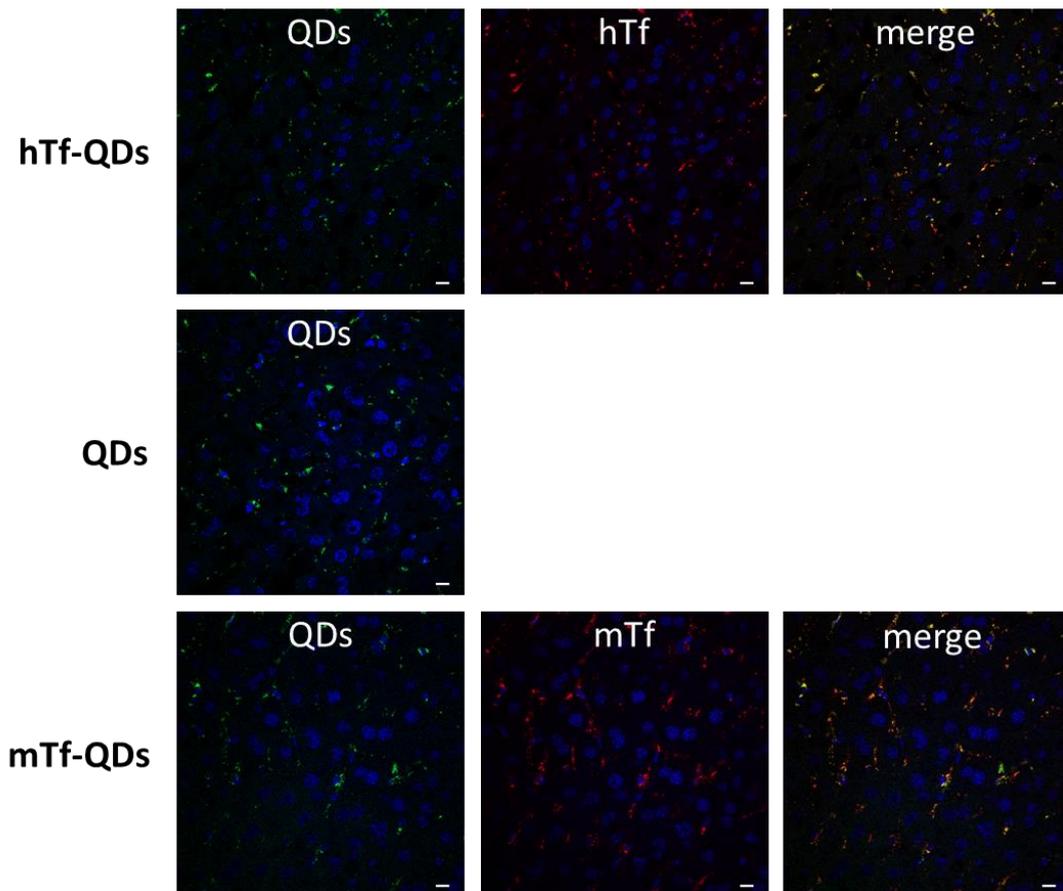


Abbildung 3.32: Konfokale *Laser-Scanning* Mikroskopie von Kryoschnitten von Mauslebern 2 h nach i.v. Injektion unterschiedlich modifizierter QDs. Polymerverpackten QDs (grün) wurden zum einen mit murinem Transferrin (mTf, rot) und zum anderen mit humanem Transferrin (hTf, rot) funktionalisiert. Die drei Formen wurden Mäusen i.v. injiziert und Kryoschnitte der Lebern für mikroskopische Untersuchungen angefertigt.

Das Verteilungsmuster der QDs in der Leber sieht für die drei injizierten Präparate sehr ähnlich aus (Abbildung 3.32). Sowohl ungekoppelte als auch mTf- und hTf-QDs scheinen in die gleichen Zelltypen aufgenommen worden zu sein, LSECs und KCs. In den größeren Hepatozyten konnten erneut keine QDs gefunden werden. Dasselbe gilt auch für die Transferrine von unterschiedlichen Spezies. Die Verteilung sieht identisch aus. Es ist aber zu erkennen, dass das jeweilige Transferrin mit den QDs kolokalisiert. Das lässt zwei

Schlussfolgerungen zu. Zum einen ist die kovalente Bindung zwischen Protein und Nanopartikel recht stabil und zum anderen scheint ungeachtet der Funktionalisierung der Partikel selbst den Aufnahmeweg zu bestimmen.

Wenn Nanopartikel in Kontakt mit biologischen Systemen wie dem Blut treten kommt es zu einer Anlagerung von Plasmaproteinen und Biomolekülen, welche eine sogenannte Proteinkorona formen¹⁶⁰. Innerhalb der Korona interagieren die Proteine unterschiedlich stark mit der Partikeloberfläche. Proteine mit geringer Affinität zum Partikel sind einem ständigen Austausch durch andere Proteine unterworfen, während Proteine mit hoher Affinität nicht von der Oberfläche verdrängt werden. Man spricht in diesen beiden Fällen von einer dynamischen bzw. harten Korona^{161,162}. Auch funktionalisierte Nanopartikel, deren Oberfläche schon mit Protein versehen ist, werden im Blutstrom mit Plasmaproteinen konfrontiert. Dem Verteilungsmuster der an QDs gekoppelten Transferrine zu urteilen, sind sie gar nicht oder zumindest nicht vollständig vom Partikel gelöst worden. Da außerdem keine Anreicherung der mit Transferrin funktionalisierten QDs in Hepatozyten zu erkennen ist, und dabei spielte es keine Rolle aus welcher Spezies das Protein stammt, liegt die Vermutung nahe, dass es keine spezifische Aufnahme durch den Transferrin Rezeptor gab, sondern eine unspezifische Endozytose der Partikel. Erst kürzlich wurde von Salvati et al. gezeigt, dass mit Transferrin funktionalisierte Nanopartikel durch die Bindung weiterer Proteine *in vitro* ihre Fähigkeit an den Transferrin Rezeptor zu binden verlieren¹⁶³. Die Formation einer Proteinkorona um den funktionalisierten Partikel oder eine teilweise Verdrängung der Transferrin Moleküle würde die gewünschte Funktion verdecken und die unspezifische Aufnahme erklären. Daher überrascht das Ergebnis nicht. *In vitro* Versuche, in denen murine Hepatozyten einer Zelllinie (α ML-12) für 3 h mit ungekoppelten und mTf-QDs inkubiert und im Anschluss für mikroskopische Untersuchungen fixiert wurden, bestätigten das Ergebnis des *in vivo*-Versuchs und Salvatis Befunde. Es war keine gesteigerte Aufnahme der funktionalisierten QDs festzustellen (Abbildung 3.33). Der Asialoglykoprotein Rezeptor gilt ebenfalls als spezifisches *Target* für Hepatozyten, da sie als einziger Zelltyp diesen in hoher Zahl exprimieren¹⁶⁴. Doch auch mit Nanopartikel Konstrukten, mit dem dafür spezifischen Liganden Asialofetuin, war keine erhöhte Aufnahme in α ML-12-Zellen zu beobachten.

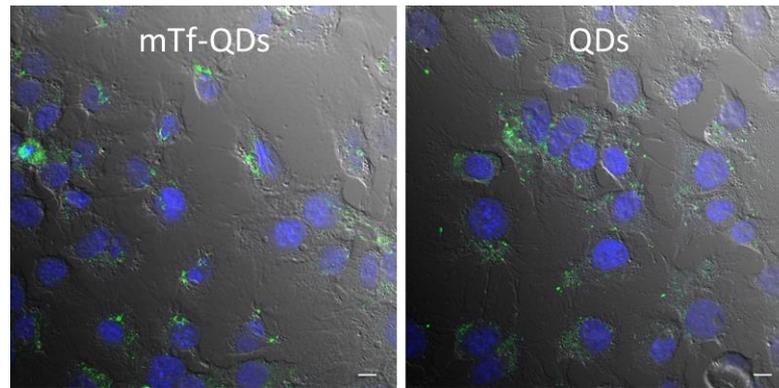


Abbildung 3.33: α ML-12-Zellen wurden für 3 h mit mTf-QDs bzw. ungekoppelten QDs inkubiert und direkt im Anschluss fixiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. Es konnte keine gesteigerte Aufnahme von mTf-QDs im Vergleich mit QDs beobachtet werden.

Die Funktionalisierung kann im Grunde wie eine künstliche harte Proteinkorona behandelt werden, die theoretisch nicht ausgetauscht werden sollte. Wang et al. zeigten kürzlich in Zellversuchen, dass selbst Proteine, die allein aufgrund starker Wechselwirkungen an die Partikel adsorbieren, so fest gebunden sind, dass sie während der Nanopartikel Aufnahme mit in die Zelle geschleust werden¹⁶⁵. Viele Erkenntnisse zur Bildung und Neubildung der Proteinkorona auf Nanopartikeln beruhen jedoch auf *in vitro*-Versuchen¹⁶⁶⁻¹⁷¹. Um das Verhalten von Partikel und Proteinkorona näher *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Doppelmarkierung von mTf-SPIOs durchgeführt. Mit Hilfe einer Radiomarkierung von sowohl Transferrin mit ¹²⁵I ($t_{1/2}=59,4$ d , γ -Strahler, 35,5 keV) als auch des Nanopartikels mit ⁵⁹Fe ist es möglich beide Bestandteile im Blut zu verfolgen und die Organverteilung quantitativ zu untersuchen. Es wurde zusätzlich geprüft, ob es Unterschiede in der Aufnahme und Verteilung der Bestandteile gibt, wenn das Transferrin a) über EDC kovalent an das den SPIO umgebende Polymer gebunden wird (im weiteren Verlauf als Tf=SPIOs geschrieben) oder b) rein durch Adsorption am SPIO haftet (Tf ~ SPIOs).

Zunächst wurden die doppelmarkierten SPIOs mittels SEC charakterisiert (Abbildung 3.34). Der Vergleich der UV-Absorptionsprofile der mit EDC gekoppelten Tf=SPIOs und der ohne EDC adsorbierten Tf ~ SPIOs zeigt, dass die Tf=SPIOs etwas früher eluieren. Im Rückschluss bedeutet das, dass die Tf=SPIOs einen größeren hydrodynamischen Durchmesser besitzen. Diese Beobachtung wurde von der Berechnung der Anzahl der Transferrinmoleküle auf der jeweiligen Partikeloberfläche gestützt. Die gekoppelten Tf=SPIOs tragen ungefähr 9 Transferrinmoleküle pro Partikel, während die adsorbierten Tf ~ SPIOs etwa 3 bis 4 Transferrinmoleküle pro Partikel aufweisen. Zusätzlich wurde die Radioaktivität der fraktionierten Eluate gemessen und mit den Absorptionsprofilen der Partikel verglichen (Abbildung 3.34). Es ist zu erkennen,

dass die Elutionsprofile beider Radioaktivitäten, also ^{125}I und ^{59}Fe , gut mit den UV-Absorptionsprofilen übereinstimmen. Man kann zudem sehen, dass die ^{125}I -Aktivität nicht nur mit monodispersen Transferrin-SPIOs koeluiert, sondern, anders als die ^{59}Fe -Aktivität, auch einen deutlichen Peak mit den agglomerierten SPIOs zeigt. Dies deutet darauf hin, dass die Agglomeration hauptsächlich auf vermehrte Protein-Protein Bindungen, welche ihrerseits an Nanopartikel binden, zurückzuführen ist.

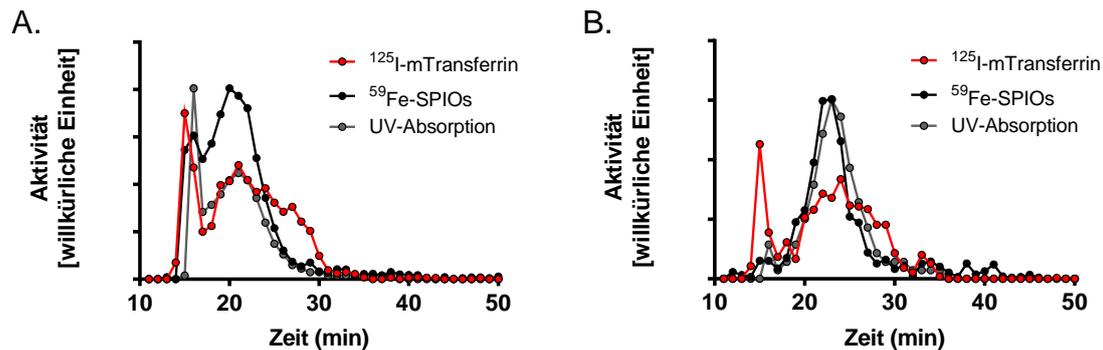


Abbildung 3.34: SEC doppelt radiomarkierter SPIOs. A.) Gekoppelte Tf=SPIOs zeigten übereinstimmende Profile in der UV-Absorption und den Aktivitäten von ^{125}I und ^{59}Fe . B.) Adsorbierte Tf ~ SPIOs zeigten ebenfalls übereinstimmende Profile in der UV-Absorption und den Aktivitäten von ^{125}I und ^{59}Fe , aber auch eine Anreicherung der ^{125}I -Aktivität an agglomerierten SPIOs.

Die analysierten Präparate sowie freies murines Transferrin wurden Versuchstieren i.v. injiziert und es wurde die Bluthalbwertszeit (BHWZ) und die Organverteilung nach 2 h ermittelt (Abbildung 3.35). Zunächst ist gut zu erkennen, dass das freie Transferrin viel langsamer (BHWZ: 7 min) und in dieser Zeit nicht vollständig aus dem Blut aufgenommen wird als an SPIOs gebundenes Transferrin. Nach etwa 20 min stellt sich ein Plateau ein, welches auf ein Gleichgewicht zwischen aufgenommenem und wieder freigesetztem Transferrin hindeuten kann. Das Verhalten von an SPIOs gebundenem Transferrin dagegen ist sehr ähnlich mit dem der SPIOs, unabhängig davon ob es kovalent gebunden oder lediglich adsorbiert war. Die Bluthalbwertszeiten betragen für ^{125}I (Transferrin) und ^{59}Fe (SPIO) jeweils 3,8 min bei den gekoppelten Tf=SPIOs und 3,6 bzw 5,0 min bei den adsorbierten Tf ~ SPIOs. Das bedeutet, dass das an SPIOs gebundene Transferrin gemeinsam mit dem Partikel aufgenommen wird.

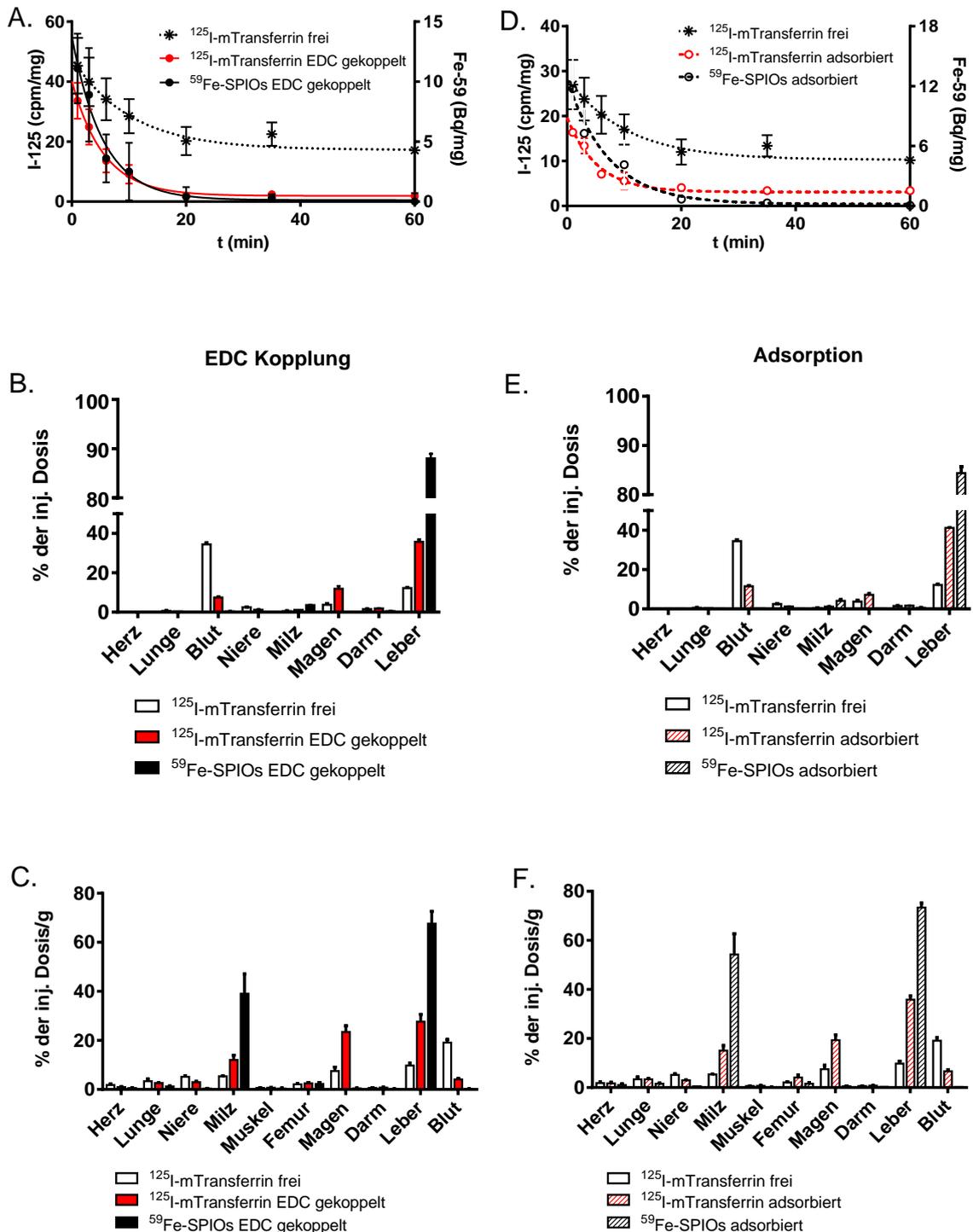


Abbildung 3.35: BHWZ und Organverteilung doppelmarkierter mTf-SPIOs. A.) BHWZ von ^{125}I -mTf= ^{59}Fe -SPIOs. B.) zeigt die prozentuale Organverteilung und C.) die spezifische Aktivität von Organen nach Gabe der doppelmarkierten mTf=SPIOs. D.) BHWZ von ^{125}I -mTf ~ ^{59}Fe -SPIOs. E.) zeigt die prozentuale Organverteilung von den doppelmarkierten mTf ~ SPIOs. F.) Spezifische Aktivität von Organen von mTf ~ SPIOs. Mittelwert \pm s.e.m. mit $n=4$

Hauptaufnahmeorgan beider Tf-SPIOs war wie erwartet die Leber. Die ^{59}Fe -Aktivität war zu fast 90 % in der Leber wiederzufinden. Die ^{125}I -Aktivität von freiem Transferrin dagegen verteilte sich auf das Blut und den Tierkörper. Die

Verteilung der ^{125}I -Aktivität von gekoppeltem bzw. adsorbiertem Transferrin war sehr ähnlich und zeigte eine Art Mischform der Verteilungsmuster von ^{59}Fe -SPIOs und freiem ^{125}I -mTransferrin. Im Gegensatz zu freiem Transferrin befand sich ein Großteil der ^{125}I -Aktivität der Tf=SPIOs und der Tf ~ SPIOs in der Leber, wenn auch deutlich weniger als ^{59}Fe -Aktivität. Andersherum war nach zwei Stunden, anders als ^{59}Fe , ^{125}I -Aktivität von Tf-SPIOs auch im Blut zu messen. Was nicht in diese Mischform passt ist eine Ansammlung der ^{125}I -Aktivität im Magen, die in der spezifischen Aktivität auffällt und nicht genau erklärt werden kann. Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass beide künstlichen Proteinkoronas im Blut bis zur Aufnahme stabil sind. Nach der Aufnahme scheint eine schnelle Prozessierung der aufgenommenen Tf-SPIOs einzusetzen und eine Umverteilung des Transferrins stattzufinden. Dabei zeugt die erhöhte ^{125}I -Aktivität im Magen davon, dass sich die Verteilung nicht ausnahmslos der physiologischen Verteilung von freiem Transferrin annähert. Nähere Untersuchungen des Plasmas ergaben, dass die gemessene ^{125}I -Aktivität ausgehend von gekoppelten Tf=SPIOs nach 120 min zum Teil nicht mehr proteingebunden vorlag. Diese Beobachtung spricht für eine Deiodierung des Proteins. Umgekehrt war die ^{125}I -Aktivität 2 h nach Gabe adsorbierter Tf ~ SPIOs immer noch an Transferrin gebunden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass trotz sehr ähnlicher Verteilungsmuster zwischen den Organen gekoppelte Tf=SPIOs und adsorbierte Tf ~ SPIOs über verschiedene Mechanismen aufgenommen und die Partikel unterschiedlich prozessiert werden, was auch eine unterschiedliche Prozessierung der Transferrine zur Folge hätte. In weiteren Zellversuchen könnte z.B. durch die Inhibierung verschiedener Aufnahmewege dieser Verdacht näher untersucht werden. Da aber das eigentliche Ziel, das Umlenken der Partikel in Hepatozyten durch eine Funktionalisierung mit Transferrin, mit dieser Methode nicht erfolgreich schien, wurde auf weitere Untersuchungen diesbezüglich verzichtet.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit der Oberflächenmodifikation von polymerverpackten SPIOs durch Transferrin, keine erhöhte Aufnahme des Partikels in Hepatozyten zu beobachten war. Zwar ist die künstlich erzeugte Proteinkorona stabil, vermochte in den Experimenten jedoch keine spezifische Umlenkung des Partikels in einen bestimmten Zelltyp zu bewirken. Außerdem ist zu erwähnen, dass für eine stabile Oberflächenfunktionalisierung nicht unbedingt eine kovalente Kopplung mit EDC notwendig ist, diese aber effektiver ist, da sich mit ihr mehr Biomoleküle pro Partikel binden lassen. Die Bindung von Molekülen auf der Oberfläche scheint jedoch nicht die Identität des Nanopartikels zu verdecken. Die Ergebnisse sprechen gegen die Vorstellung, Nanopartikel durch pure Oberflächenmodifikation mit Proteinen im lebenden

Organismus aktiv umlenken zu können und spiegeln die Schwierigkeit in der klinischen Forschung wider, solch ein Vehikel zu designen.

3.3.2 Physiologische Funktionalisierung

Das vorangegangene Kapitel befasste sich mit der Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln, mit dessen Hilfe ein verändertes Verteilungsmuster des Partikels erzielt werden sollte. Die so veränderten Nanopartikel ließen zwar keine veränderte Verteilung erkennen, die Untersuchungen stellten aber heraus, dass so die an den Nanokristall gebundenen Proteine mit dem Partikel in die entsprechenden Zellen geschleust wurden. Dieses Prinzip des Mitreisenden sollte für eine weitere Untersuchung im Bereich des *Targetings* genutzt werden. Die Rollen wurden insofern vertauscht, dass die Nanopartikel nicht Trägermaterial waren, sondern Mitreisende wie in einem trojanischen Pferd und damit ein passives *Targeting* erzielt werden sollte. Für die Experimente wurden die, nach der Synthese ölsäurestabilisierten, SPIOs nicht mit dem amphiphilen Polymer umhüllt, sondern in das Innere von rekombinanten triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) eingebettet (Abbildung 3.36).

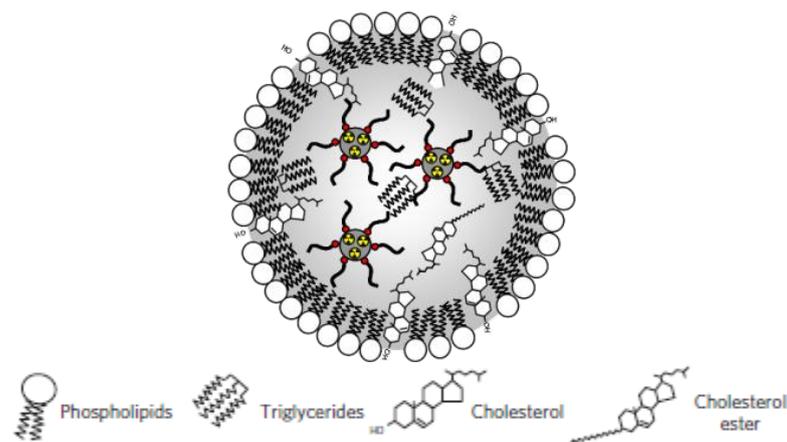


Abbildung 3.36: Radiomarkierte SPIOs, eingebettet in ein Lipoprotein. Das Lipoprotein übernimmt die Rolle eines trojanischen Pferdes.

Die rekombinanten TRL werden aus Lipiden humaner TRL synthetisiert, sie unterscheiden sich jedoch von diesen dadurch, dass ihnen die charakteristischen Apolipoproteine auf der Oberfläche fehlen. Die Einbettung von SPIOs oder auch QDs kann unter anderem dazu genutzt werden, den Lipidstoffwechsel zu untersuchen. Die Nanokristalle reisen dann wie in einem trojanischen Pferd unerkant von ihrer Umgebung in diesen ‚Nanosomen‘ mit. Mit Hilfe dieser Bauart kann die Organaufnahme von Lipoproteinen *in vivo* visualisiert und quantifiziert und auch gezeigt werden, dass eine Aktivierung des

braunen Fettgewebes durch Kälte die TRL Aufnahme in dieses Organ steigert^{54,172}.

Durch die Kälteaktivierung war auch eine gesteigerte TRL-Aufnahme in Hepatozyten zu erkennen. Diese Beobachtung sollte quantifiziert werden. Dafür wurden Mäusen ⁵⁹Fe-SPIOs markierte rekombinante TRL i.v. injiziert und 1 h nach Gabe Hepatozyten nach der schon beschriebenen Vorgehensweise isoliert. Eine Tiergruppe war für 24 h vor Injektion der Kälte (4 °C) ausgesetzt, die andere Gruppe wurde bei etwa 25 °C gehalten. Die Verteilung der Aktivität zwischen den Bestandteilen der Leber zeigte einen erhöhten Wert im Tierkörper nach Kälteaktivierung (Abbildung 3.37 A.). Obwohl nicht explizit in diesem Experiment untersucht ist dies wahrscheinlich auf eine gesteigerte Aufnahme der rekombinanten TRL in das braune Fettgewebe zurückzuführen. Außerdem fällt auf, dass nach Kälteaktivierung die Aktivität im Nicht-Parenchym niedriger ist als bei warm gehaltenen Tieren. Der prozentuale Anteil der Aktivität in den vitalen Hepatozyten ist bei beiden Gruppen verhältnismäßig niedrig. Normiert auf die Zellzahl war jedoch ein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität zu erkennen (Abbildung 3.37 B.). Hochgerechnet auf die Gesamtheptozyten sind nach Kälteaktivierung über 60 % der Aktivität in der Leber auf das Parenchym verteilt. Der Effekt kann auf eine erhöhte Expression der Lipoproteinlipase (LPL) in der Kälte zurückgeführt werden^{173,174}. Die damit verbundene gesteigerte LPL-Aktivität hat eine verstärkte Lipolyse von TRL und somit einen erhöhten Umsatz zur Folge. Die vermehrte Bildung von TRL-Remnants führt wohl zu einer effizienteren Aufnahme in Hepatozyten, die durch eine Bindung von LPL an TRL-Remnants noch verstärkt wird¹⁷⁵.

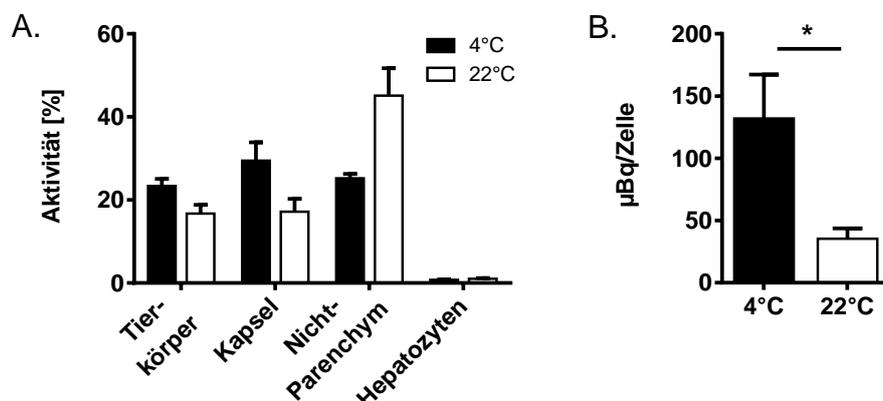


Abbildung 3.37: Verteilung der ⁵⁹Fe-Aktivität innerhalb der Leber nach Gabe von in TRL eingebetteten SPIOs. A.) Verteilung der Aktivität zwischen den Bestandteilen der Leber nach der Präparation. B.) Aktivität auf die Zellzahl normiert. Mittelwert +/- s.e.m. mit n≥3

Durch die Veränderung der Hülle der Nanopartikel und indem man Gebrauch von einer physiologischen Veränderung des Organismus nach Kälteaktivierung machte, waren erhöhte Aktivitäten in Hepatozyten zu erkennen. Der Anteil der Aktivität innerhalb der Leber konnte von knapp 30 % bei warmen Tieren auf über 60 % bei kalten Tieren erhöht werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass ein gezieltes *Targeting* von Nanopartikeln nicht trivial ist. Viele der bisher entwickelten Nanopartikel für den gezielten Transport befinden sich noch in der präklinischen Forschung. Der Ansatz spezifische Liganden des Zielorgans oder der Zielzelle auf die Oberfläche von Nanopartikeln zu binden ist vielversprechend. Gleichzeitig ist es offensichtlich notwendig die Bluthalbwertszeit der Partikel zu verlängern, damit sie nicht unvermittelt von Zellen des Mononukleären Phagozyten Systems aufgenommen werden. Die Verlängerung der Bluthalbwertszeit wird vor allem durch das Versehen der Partikeloberfläche mit PEG-Ketten erreicht. Diese postsynthetische Modifikation des Partikels mit dem chemisch inerten Molekül erschwert aber gleichzeitig die weitere Bindung von Biomolekülen. Daher muss ein Kompromiss gefunden werden, bei dem die Bluthalbwertszeit der Partikel noch verlängert wird, aber auch Biomoleküle noch gebunden werden können und diese durch weitere Biomoleküle im Blutstrom nicht maskiert werden. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung einer anderen Hülle, deren physiologische Verteilung genutzt wird. Bei der Einbettung der Nanokristalle in TRL bedient man sich der natürlichen Verteilung dieses Vehikels. Es scheint als wenn die Nanopartikel in dieser Arbeit quasi passiv umgelenkt werden konnten, indem die biochemischen Vorgänge im Organismus manipuliert wurden. So wird hier eine Art physiologische Funktionalisierung durchgeführt, bei der durch Kälteadaptation die Aufnahme von SPIOs enthaltenden rekombinanten TRL vermehrt in Hepatozyten gelenkt wird.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bioverteilung von polymerumhüllten superparamagnetischen Eisenoxid-Nanokristallen (SPIOs) und Quantum Dots (QDs) in Mäusen nach *i.v.* Injektion untersucht. Dies erfolgte unter anderem unter Zuhilfenahme einer postsynthetischen Radiomarkierung der cadmiumbasierten QDs mit ^{65}Zn und der SPIOs mit ^{51}Cr .

Eine postsynthetische Radiomarkierung der äußersten ZnS-Schale von QDs mit ^{65}Zn resultierte in einem labilen *Label*, das bei der ultraschallgesteuerten Polymerverpackung zum Teil verloren ging. Es konnte dennoch dazu genutzt werden, Grundzüge der Bioverteilung von polymerumhüllten QDs zu untersuchen. Die QDs reichert sich in kurzer Zeit (2 h) vorrangig in der Leber an. In einem Zeitraum von vier Wochen kam es zu einer Umverteilung der ^{65}Zn -Aktivität, die auf eine partielle Degradation der QDs zurückzuführen war.

Im Gegensatz zu den ^{65}Zn -markierten QDs, zeigten die mit ^{51}Cr radiomarkierten Eisenoxid-Nanokristalle ein stabiles *Label*. Analog zu den QDs erlaubte dieses die Verfolgung der Kurzzeitverteilung der SPIOs und wies eine Anreicherung in der Leber nach. Anders als die Zinkaktivität retinierte die ^{51}Cr -Aktivität über einen Zeitraum von vier Wochen weitestgehend in der Leber, obwohl die Partikel schon größtenteils degradiert waren, wie bereits frühere Studien gezeigt haben. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen spezifischen Export von dreiwertigen Chromionen aus Leberzellen, was nach bisherigen Modellen physiologisch möglich sein müsste. Sie unterstützen daher die These, dass Chrom kein essentielles Spurenelement ist, obwohl dies in der Literatur seit nun mehr 50 Jahren diskutiert wird.

Von bisherigen Studien war bekannt, dass die hier verwendeten polymerverpackten Nanopartikel nach *i.v.* Injektion im Wesentlichen vom Mononukleären Phagozyten System der Leber, also von Kupffer-Zellen (KC) und sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), aufgenommen werden. In verschiedenen Experimenten wurde nun versucht, die Verteilung zu quantifizieren und zusätzlich die Rolle von Hepatozyten an der direkten Nanopartikel-Aufnahme genauer zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig eine Methode, bei der primäre murine Leberzellen, welche SPIOs aus einer *i.v.* Injektion aufgenommen haben, mithilfe einer Säule in einem Magnetfeld isoliert werden können. Immunzytochemische Färbungen sowie Analysen mittels Durchflusszytometrie zeigten, dass KC und LSEC die Partikel zu fast gleichen Teilen aufnehmen. Ein vergleichbares Bild ergab sich

bei mikroskopischen Untersuchungen von murinen Lebergewebsproben nach Injektion von polymerumhüllten QDs. Eine direkte Nanopartikel-Aufnahme in Hepatozyten konnte *in vivo* nicht beobachtet werden, obwohl diese Zellen die Mehrzahl der Leberzellen ausmachen und aufgrund der Partikelgröße theoretisch auch direkt erreicht werden könnten. Wurden hingegen primäre Hepatozyten 2 h nach Injektion von ^{59}Fe -markierten SPIOs präpariert, war Aktivität in den Zellen zu finden. Unter Berücksichtigung der übrigen Befunde, wurde dieses Ergebnis als rasche Zulieferung von freigesetztem Eisen aus metabolisierten SPIOs aus anderen Leberzellen gewertet.

In weiteren Versuchen wurde die Möglichkeit untersucht, ob durch Kopplung von Proteinen an die Nanopartikel ein aktives Umlenken der Nanopartikel in Hepatozyten hinein ermöglicht werden kann. Als Ligand wurde Transferrin ausgewählt, dessen hohe Affinität für Hepatozyten *in vivo* weitläufig bekannt ist. Sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* konnte jedoch keine verstärkte Aufnahme von entsprechenden Nanopartikel-Konstrukten in Hepatozyten gefunden werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Protein für das spezifische *Targeting in vivo* durch die rasche Bildung einer Proteinkorona maskiert wird und deshalb nicht mehr von den Zellen erkannt werden kann.

In Studien mit ^{59}Fe -markierten SPIOs und daran gebundenem, ^{125}I -markiertem, murinen Transferrin wurde der Einfluss der Proteinkorona-Bildung auf die Aufnahme in Leberzellen von Mäusen *in vivo* direkt untersucht. Dabei wurden Nanopartikel-Konstrukte mit kovalent gebundenem ^{125}I -Transferrin mit Konstrukten verglichen, an welche Transferrin nur adsorbiert war. In beiden Fällen fand sich kein Unterschied in der Verteilung der *Label* und Transferrin wurde wie der Partikel selbst rasch aus dem Plasma entfernt und von der Leber aufgenommen. Dies zeigte, dass die rasche Korona-Bildung *in vivo* die Transferrin Moleküle zwar nicht von der Partikeloberfläche verdrängt, sehr wohl aber in der Lage zu sein scheint, sie zu maskieren.

Ein Ansatz für ein spezifisches *Targeting* gelang schließlich mit der Wahl einer anderen Hülle. Wurden Nanopartikel in rekombinante Lipoproteinmizellen eingebettet und die Mäuse vor *i.v.* Injektion einer Kälteaktivierung unterzogen, konnten höhere Aktivitäten in Hepatozyten verzeichnet werden, welche auf eine direkte Partikelaufnahme zurückgeführt wurden.

Die Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Verhaltens von Nanokristallen in einer biologischen Umgebung, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Ergebnisse wurden in zwei Manuskripten zusammengefasst und zur Publikation eingereicht (*Beilstein Journal of Nanotechnology*).

5 Summary

In this study a postsynthetic radiolabelling of superparamagnetic iron oxide nanocrystals (SPIOs) with ^{51}Cr , and of cadmium-based Quantum Dots (QDs) with ^{65}Zn , was used to study the biodistribution of these nanoparticles in mice post *i.v.* injection.

A postsynthetic radiolabelling of QDs with ^{65}Zn resulted in an unstable label that was partially lost in the sonication-guided polymer-coating. Nevertheless it could be used to investigate basic principles of the biodistribution of the QDs. The QDs showed an accumulation in the liver in the short-term distribution. Moreover a redistribution of the ^{65}Zn -label in a time period of four weeks was attributed to a partial degradation of the QDs.

The radiolabelling of SPIOs with ^{51}Cr gave a stable label, which enabled the short-term biodistribution of SPIOs to be followed. Moreover our results showed that the ^{51}Cr activity is, in most instances, retained in the liver for four weeks, even though the particles were already largely degraded (according to results from ^{59}Fe -SPIOs). These findings argue against a specific export of trivalent chromium ions from liver cells, although this should be possible according to previous models in the literature. It supports the idea that chromium is not an essential trace element, as was first discussed 50 years ago.

From previous studies it was known that the polymer-coated SPIOs used here are predominantly taken up by the mononuclear phagocyte system of the liver post *i.v.* injection, meaning Kupffer cells (KC) and sinusoidal endothelial cells (LSEC). Various experiments were undertaken, to quantify the distribution and to investigate the role of hepatocytes in direct nanoparticle uptake. A method has been developed in which murine non-parenchymal cells, ingesting SPIOs through *i.v.* injection, were isolated using a column in a magnetic field. Immunocytochemical staining and flow cytometry-analysis showed that KC and LSEC incorporate the particles in almost equal quantities. A similar pattern was evident in microscopic examinations of murine liver tissue after injection of polymer-coated QDs. No uptake of nanoparticles into hepatocytes could be observed *in vivo*, although in theory this should be possible in hepatocytes due to the particle size. However, there could be evidence found of activity in hepatocytes isolated 2 h post *i.v.* injection of ^{59}Fe -SPIOs. But taking into account the remaining findings, this hepatocyte activity was attributed to a rapid degradation of the particles in non-parenchymal cells and the subsequent transport of released iron into hepatocytes.

Furthermore it was investigated whether it is possible to guide nanoparticles into hepatocytes by coupling of proteins to the nanoparticle surface. For this purpose transferrin was selected as high affinity ligands for hepatocytes. However, no increased uptake of those modified nanoparticles into hepatocytes could be found, either in cell culture models or with *in vivo* experiments. It appeared possible that the protein for the specific targeting is masked by the rapid formation of a protein corona *in vivo* and cannot be detected anymore by the hepatocytes.

Therefore protein corona formation and its influence on the uptake of modified nanoparticles into the liver of mice was examined by using ^{125}I -labelled murine transferrin coupled to ^{59}Fe -SPIOs. At the same time properties of those constructs were compared to nanoparticle constructs on which transferrin was merely adsorbed during incubation. No difference in the biodistribution of the labels of both constructs was found. Transferrin molecules bound to the particles were rapidly cleared from plasma and taken up by the liver. The experiment showed that the transferrin molecules were not displaced from the particle surface during protein corona formation, but may be masked by it.

An approach for a targeted delivery was finally achieved by choosing another surface modification. Nanoparticles were embedded in recombinant lipoprotein micelles. A simultaneous cold exposure of 24 h pre *i.v.* injection resulted in an increased hepatocyte activity, which was probably caused by nanoparticle uptake in hepatocytes.

This work provides an important contribution to our understanding of the behaviour of nanocrystals in a biological environment, both *in vitro* and *in vivo*. The results were submitted for publication (*Beilstein Journal of Nanotechnology*).

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P. & Wiesner, M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology* **4**, 634-641 (2009).
2. Weller, H. Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* **32**, 41-53 (1993).
3. Chou, L.Y., Ming, K. & Chan, W.C. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chemical Society reviews* **40**, 233-245 (2011).
4. Saini, S., Stark, D.D., Hahn, P.F., Bousquet, J.C., Introcasso, J., Wittenberg, J., Brady, T.J. & Ferrucci, J.T., Jr. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma. *Radiology* **162**, 217-222 (1987).
5. Saini, S., Stark, D.D., Hahn, P.F., Wittenberg, J., Brady, T.J. & Ferrucci, J.T., Jr. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* **162**, 211-216 (1987).
6. Weissleder, R., Hahn, P.F., Stark, D.D., Rummeny, E., Saini, S., Wittenberg, J. & Ferrucci, J.T. MR imaging of splenic metastases: ferrite-enhanced detection in rats. *AJR. American journal of roentgenology* **149**, 723-726 (1987).
7. Weissleder, R., Stark, D.D., Compton, C.C., Wittenberg, J. & Ferrucci, J.T. Ferrite-enhanced MR imaging of hepatic lymphoma: an experimental study in rats. *AJR. American journal of roentgenology* **149**, 1161-1165 (1987).
8. Saini, S. & Ferrucci, J.T. Ferrite particles as an MR contrast agent. *Radiology* **169**, 656 (1988).
9. 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. American journal of roentgenology* **152**, 167-173 (1989).
10. Ferrucci, J.T. & Stark, D.D. Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years. *AJR. American journal of roentgenology* **155**, 943-950 (1990).
11. Saebo, K.B. Degradation, Metabolism and Relaxation Properties of Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Imaging. *Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*, 92 (2004).

12. Dilcher, L., Venator, M. & Dilcher, S. *Handbuch der Kernspintomographie*, (Edwin Ferger Verlag, Bergisch Gladbach, 2004).
13. Wisner, E.R., Amparo, E.G., Vera, D.R., Brock, J.M., Barlow, T.W., Griffey, S.M., Drake, C. & Katzberg, R.W. Arabinogalactan-coated superparamagnetic iron oxide: effect of particle size in liver MRI. *Journal of computer assisted tomography* **19**, 211-215 (1995).
14. Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J. & Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of microencapsulation* **13**, 245-255 (1996).
15. Rety, F., Clement, O., Siauve, N., Cuenod, C.A., Carnot, F., Sich, M., Buisine, A. & Frija, G. MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats: pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* **12**, 734-739 (2000).
16. Allkemper, T., Bremer, C., Matuszewski, L., Ebert, W. & Reimer, P. Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits. *Radiology* **223**, 432-438 (2002).
17. Gordon, S. & Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* **5**, 953-964 (2005).
18. Hume, D.A. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology* **18**, 49-53 (2006).
19. Clement, O., Siauve, N., Cuenod, C.A., Vuillemin-Bodaghi, V., Leconte, I. & Frija, G. Mechanisms of action of liver contrast agents: impact for clinical use. *Journal of computer assisted tomography* **23 Suppl 1**, S45-52 (1999).
20. Wang, Y.X. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery* **1**, 35-40 (2011).
21. Frey, N.A., Peng, S., Cheng, K. & Sun, S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chemical Society reviews* **38**, 2532-2542 (2009).
22. Huber, D.L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **1**, 482-501 (2005).
23. Ittrich, H., Peldschus, K., Raabe, N., Kaul, M. & Adam, G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* **185**, 1149-1166 (2013).
24. Hahn, P.F., Stark, D.D. & Ferrucci, J.T. Accumulation of iron oxide particles around liver metastases during MR imaging. *Gastrointestinal radiology* **17**, 173-174 (1992).
25. Moore, A., Marecos, E., Bogdanov, A., Jr. & Weissleder, R. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology* **214**, 568-574 (2000).

26. Zimmer, C., Weissleder, R., Poss, K., Bogdanova, A., Wright, S.C., Jr. & Enochs, W.S. MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiology* **197**, 533-538 (1995).
27. Artemov, D., Mori, N., Ravi, R. & Bhujwala, Z.M. Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor. *Cancer research* **63**, 2723-2727 (2003).
28. 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. *Academic radiology* **11**, 996-1004 (2004).
29. 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. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 12387-12391 (2005).
30. Sudimack, J. & Lee, R.J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced drug delivery reviews* **41**, 147-162 (2000).
31. Quan, Q., Xie, J., Gao, H., Yang, M., Zhang, F., Liu, G., Lin, X., Wang, A., Eden, H.S., Lee, S., Zhang, G. & Chen, X. HSA coated iron oxide nanoparticles as drug delivery vehicles for cancer therapy. *Molecular pharmaceutics* **8**, 1669-1676 (2011).
32. Yu, M.K., Jeong, Y.Y., Park, J., Park, S., Kim, J.W., Min, J.J., Kim, K. & Jon, S. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angewandte Chemie* **47**, 5362-5365 (2008).
33. Johannsen, M., Gneveckow, U., Thiesen, B., Taymoorian, K., Cho, C.H., Waldofner, N., Scholz, R., Jordan, A., Loening, S.A. & Wust, P. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *European urology* **52**, 1653-1661 (2007).
34. Power, S., Slattery, M.M. & Lee, M.J. Nanotechnology and its relationship to interventional radiology. Part II: Drug Delivery, Thermotherapy, and Vascular Intervention. *Cardiovascular and interventional radiology* **34**, 676-690 (2011).
35. Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V. & Jordan, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology* **103**, 317-324 (2011).
36. Laurent, S. & Mahmoudi, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics* **2**, 367-390 (2011).
37. Reiss, P., Protiere, M. & Li, L. Core/Shell semiconductor nanocrystals. *Small* **5**, 154-168 (2009).

38. Cheki, M., Moslehi, M. & Assadi, M. Marvelous applications of quantum dots. *European review for medical and pharmacological sciences* **17**, 1141-1148 (2013).
39. Ekimov, A.I., Efros, A.L. & Onushchenko, A.A. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Communications* **56**, 921-924 (1985).
40. 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. *J Chem Phys* **79**, 1086-1088 (1983).
41. Brus, L.E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J Chem Phys* **80**, 4403-4409 (1984).
42. Klostranec, J.M. & Chan, W.C.W. Quantum Dots in Biological and Biomedical Research. *Advanced materials* **18**, 1953-1964 (2006).
43. de Mello Donega, C. Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals. *Chemical Society reviews* **40**, 1512-1546 (2011).
44. Pathak, S., Choi, S.K., Arnheim, N. & Thompson, M.E. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 4103-4104 (2001).
45. 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).
46. Hanaki, K., Momo, A., Oku, T., Komoto, A., Maenosono, S., Yamaguchi, Y. & Yamamoto, K. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 496-501 (2003).
47. Sukhanova, A., Devy, J., Venteo, L., Kaplan, H., Artemyev, M., Oleinikov, V., Klinov, D., Pluot, M., Cohen, J.H. & Nabiev, I. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Analytical biochemistry* **324**, 60-67 (2004).
48. Jaiswal, J.K., Mattoussi, H., Mauro, J.M. & Simon, S.M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature biotechnology* **21**, 47-51 (2003).
49. Kaul, Z., Yaguchi, T., Kaul, S.C., Hirano, T., Wadhwa, R. & Taira, K. Mortalin imaging in normal and cancer cells with quantum dot immunoconjugates. *Cell research* **13**, 503-507 (2003).
50. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. & Yamamoto, K. Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 46-53 (2004).
51. 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. *Nature biotechnology* **22**, 198-203 (2004).

52. 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).
53. 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).
54. 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., Eychemuller, 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).
55. Levene, M.J., Dombeck, D.A., Kasischke, K.A., Molloy, R.P. & Webb, W.W. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of neurophysiology* **91**, 1908-1912 (2004).
56. 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. *Nature biotechnology* **22**, 93-97 (2004).
57. 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. *The Annals of thoracic surgery* **79**, 269-277; discussion 269-277 (2005).
58. 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* **9**, 2354-2359 (2009).
59. 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. *Annals of surgical oncology* **13**, 386-396 (2006).
60. Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology* **22**, 969-976 (2004).
61. Weng, K.C., Noble, C.O., Papahadjopoulos-Sternberg, B., Chen, F.F., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Wang, D., Hom, Y.K., Hann, B. & Park, J.W. Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo. *Nano letters* **8**, 2851-2857 (2008).
62. Yu, X., Chen, L., Li, K., Li, Y., Xiao, S., Luo, X., Liu, J., Zhou, L., Deng, Y., Pang, D. & Wang, Q. Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo. *Journal of biomedical optics* **12**, 014008 (2007).

63. Fang, M., Peng, C.W., Pang, D.W. & Li, Y. Quantum dots for cancer research: current status, remaining issues, and future perspectives. *Cancer biology & medicine* **9**, 151-163 (2012).
64. 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).
65. Kim, S., Park, J., Kim, T., Jang, E., Jun, S., Jang, H., Kim, B. & Kim, S.W. Reverse type-I ZnSe/InP/ZnS core/shell/shell nanocrystals: cadmium-free quantum dots for visible luminescence. *Small* **7**, 70-73 (2011).
66. Mandal, G., Darragh, M., Wang, Y.A. & Heyes, C.D. Cadmium-free quantum dots as time-gated bioimaging probes in highly-autofluorescent human breast cancer cells. *Chemical communications* **49**, 624-626 (2013).
67. Pons, T., Pic, E., Lequeux, N., Cassette, E., Bezdetrnaya, L., Guillemin, F., Marchal, F. & Dubertret, B. Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS nano* **4**, 2531-2538 (2010).
68. Wang, X., Zhuang, J., Peng, Q. & Li, Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature* **437**, 121-124 (2005).
69. Park, J., Joo, J., Kwon, S.G., Jang, Y. & Hyeon, T. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angewandte Chemie* **46**, 4630-4660 (2007).
70. 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).
71. Lacroix, L.M., Delpech, F., Nayral, C., Lachaize, S. & Chaudret, B. New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for real-time imaging. *Interface focus* **3**, 20120103 (2013).
72. Hevesy, G. The Absorption and Translocation of Lead by Plants: A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *The Biochemical journal* **17**, 439-445 (1923).
73. Ostrowski, W. [George Hevesy inventor of isotope methods in biochemical studies]. *Postepy biochemii* **14**, 149-153 (1968).
74. Myers, W.G. Georg Charles de Hevesy: the father of nuclear medicine. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **20**, 590-594 (1979).
75. Kramer-Marek, G. & Capala, J. The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **33**, 629-640 (2012).
76. Lee, H.Y., Li, Z., Chen, K., Hsu, A.R., Xu, C., Xie, J., Sun, S. & Chen, X. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *Journal of*

- nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **49**, 1371-1379 (2008).
77. Sankaranarayanan, K. & Chakraborty, R. Cancer predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation-induced cancers. I. Background. *Radiation research* **143**, 121-143 (1995).
 78. Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 145-160 (2005).
 79. de Barros, A.B., Tsourkas, A., Saboury, B., Cardoso, V.N. & Alavi, A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI research* **2**, 39 (2012).
 80. Hong, H., Zhang, Y., Sun, J. & Cai, W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano today* **4**, 399-413 (2009).
 81. Cai, W., Chen, K., Li, Z.B., Gambhir, S.S. & Chen, X. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **48**, 1862-1870 (2007).
 82. Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R.J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E. & Parak, F. Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *Journal of drug targeting* **11**, 139-149 (2003).
 83. Zhu, M.T., Feng, W.Y., Wang, Y., Wang, B., Wang, M., Ouyang, H., Zhao, Y.L. & Chai, Z.F. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **107**, 342-351 (2009).
 84. Freund, B. Synthese und in vivo Charakterisierung von ⁵⁹Fe-markierten, monodispersen, superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln. *E-Dissertation der UHH* (2012).
 85. Freund, B., Tromsdorf, U.I., Bruns, O.T., Heine, M., Giemsa, A., Bartelt, A., Salmen, S.C., Raabe, N., Heeren, J., Ittrich, H., Reimer, R., Hohenberg, H., Schumacher, U., Weller, H. & Nielsen, P. A simple and widely applicable method to ⁵⁹Fe-radiolabel monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo quantification studies. *ACS nano* **6**, 7318-7325 (2012).
 86. Woodward, J.D., Kennel, S.J., Mirzadeh, S., Dai, S., Wall, J.S., Richey, T., Avenell, J. & Rondinone, A.J. In vivo SPECT/CT imaging and biodistribution using radioactive Cd(125m)Te/ZnS nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 5 (2007).
 87. Sun, M., Hoffman, D., Sundaresan, G., Yang, L., Lamichhane, N. & Zweit, J. Synthesis and characterization of intrinsically radiolabeled quantum dots for bimodal detection. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2**, 122-135 (2012).
 88. Vincent, J.B. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton transactions* **39**, 3787-3794 (2010).

89. Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M. & Hirano, T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **16**, 1123-1134 (2011).
90. Lichten, L.A. & Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual review of nutrition* **29**, 153-176 (2009).
91. Grennan, A.K. Metallothioneins, a diverse protein family. *Plant physiology* **155**, 1750-1751 (2011).
92. Chen, C. & Paw, B.H. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 1459-1467 (2012).
93. McKie, A.T. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society transactions* **36**, 1239-1241 (2008).
94. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. & McKie, A.T. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**, 789-801 (2005).
95. Ponka, P. & Lok, C.N. The transferrin receptor: role in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**, 1111-1137 (1999).
96. Johnson, M.B., Chen, J., Murchison, N., Green, F.A. & Enns, C.A. Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Molecular biology of the cell* **18**, 743-754 (2007).
97. Wallander, M.L., Leibold, E.A. & Eisenstein, R.S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1763**, 668-689 (2006).
98. Andrews, N.C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature reviews. Genetics* **1**, 208-217 (2000).
99. Knutson, M. & Wessling-Resnick, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **38**, 61-88 (2003).
100. Yu, W.W., Falkner, J.C., Yavuz, C.T. & Colvin, V.L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chemical communications*, 2306-2307 (2004).
101. Li, J.J., Wang, Y.A., Guo, W., Keay, J.C., Mishima, T.D., Johnson, M.B. & Peng, X. Large-scale synthesis of nearly monodisperse CdSe/CdS core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 12567-12575 (2003).
102. Chursanova, M.V., Dzhagan, V.M., Yukhymchuk, V.O., Lytvyn, O.S., Valakh, M.Y., Khodasevich, I.A., Lehmann, D., Zahn, D.R., Waurisch, C. & Hickey, S.G. Nanostructured Silver Substrates With Stable and Universal SERS Properties: Application to Organic Molecules and Semiconductor Nanoparticles. *Nanoscale research letters* **5**, 403-409 (2009).

103. Panda, S.K., Hickey, S.G., Demir, H.V. & Eychmuller, A. Bright white-light emitting manganese and copper co-doped ZnSe quantum dots. *Angewandte Chemie* **50**, 4432-4436 (2011).
104. Shtykova, E.V., Huang, X., Gao, X., Dyke, J.C., Schmucker, A.L., Dragnea, B., Remmes, N., Baxter, D.V., Stein, B., Konarev, P.V., Svergun, D.I. & Bronstein, L.M. Hydrophilic Monodisperse Magnetic Nanoparticles Protected by an Amphiphilic Alternating Copolymer. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **112**, 16809-16817 (2008).
105. Sperling, R.A., Pellegrino, T., Li, J.K., Chang, W.H. & Parak, W.J. Electrophoretic Separation of Nanoparticles with a Discrete Number of Functional Groups. *Advanced Functional Materials* **16**, 943-948 (2006).
106. Braunsfurth, J.S., Gabbe, E.E. & Heinrich, H.C. Performance parameters of the Hamburg 4 pi whole body radioactivity detector. *Physics in medicine and biology* **22**, 1-17 (1977).
107. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275 (1951).
108. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. (eds. Versuchstierkunde, G.f. & Tierschutz, T.V.f.) (2009).
109. Shannon, R.D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A* **32**, 751-767 (1976).
110. Pellegrino, T., Manna, L., Kudera, S., Liedl, T., Koktysh, D., Rogach, A.L., Keller, S., Rädler, J., Natile, G. & Parak, W.J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Letters* **4**, 703-707 (2004).
111. Janczewski, D., Tomczak, N., Han, M.Y. & Vancso, G.J. Synthesis of functionalized amphiphilic polymers for coating quantum dots. *Nature protocols* **6**, 1546-1553 (2011).
112. Mazumder, S., Dey, R., Mitra, M.K., Mukherjee, S. & Das, G.C. Review: Biofunctionalized Quantum Dots in Biology and Medicine. *Journal of Nanomaterials* **2009**, 17 (2009).
113. Lin, C.A., Sperling, R.A., Li, J.K., Yang, T.Y., Li, P.Y., Zanella, M., Chang, W.H. & Parak, W.J. Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small* **4**, 334-341 (2008).
114. Garrick, M.D. & Garrick, L.M. Cellular iron transport. *Biochimica et biophysica acta* **1790**, 309-325 (2009).
115. Schwarz, K. & Mertz, W. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Arch Biochem Biophys* **72**, 515-518 (1957).
116. Di Bona, K.R., Love, S., Rhodes, N.R., McAdory, D., Sinha, S.H., Kern, N., Kent, J., Strickland, J., Wilson, A., Beard, J., Ramage, J., Rasco, J.F. & Vincent, J.B. Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a "low-chromium" diet. *Journal of biological inorganic chemistry*

- : *JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **16**, 381-390 (2011).
117. Brock, J.H. Transferrins. in *Metalloproteins*, Vol. 2 (ed. Harrison, P.M.) 183-262 (MacMillan, London, UK, 1985).
 118. Quarles, C.D.J., Marcus, R.K. & Brumaghim, J.L. Competitive binding of Fe³⁺, Cr³⁺, and Ni²⁺ to transferrin. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **16**, 913-921 (2011).
 119. Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in cell biology* **5**, 85-87 (1995).
 120. Elliott, M.R. & Ravichandran, K.S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of cell biology* **189**, 1059-1070 (2010).
 121. Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M.J., Spetz, A.L. & Holmgren, L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6407-6411 (2001).
 122. Rautou, P.E. & Mackman, N. Deletion of microvesicles from the circulation. *Circulation* **125**, 1601-1604 (2012).
 123. Dignat-George, F. & Boulanger, C.M. The many faces of endothelial microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 27-33 (2011).
 124. van der Pol, E., Boing, A.N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews* **64**, 676-705 (2012).
 125. Bargheer, D., Giemsa, A., Freund, B., Heine, M., Waurisch, C., Stachowski, G.M., Hickey, S.G., Eychmüller, A., Heeren, J. & Nielsen, P. The Distribution and Degradation of Radiolabelled SPIOs and Quantum Dots in Mice. (2014). Manuskript eingereicht bei *Beilstein Journal of Nanotechnology*
 126. Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M. & Epple, M. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials* **22**, 4548-4554 (2010).
 127. Yang, X., Gondikas, A.P., Marinakos, S.M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H. & Meyer, J.N. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology* **46**, 1119-1127 (2012).
 128. Tapiero, H. & Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **57**, 399-411 (2003).
 129. McLean, J.A. & Speakman, J.R. Elimination rate of ⁶⁵Zn as a measure of food intake: a validation study in the mouse (*Mus sp.*). *Journal of applied physiology* **79**, 1361-1369 (1995).

130. Sparacino, G., Shames, D.M., Vicini, P., King, J.C. & Cobelli, C. Double isotope tracer method for measuring fractional zinc absorption: theoretical analysis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **282**, E679-687 (2002).
131. Liuzzi, J.P. & Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters. *Annual review of nutrition* **24**, 151-172 (2004).
132. Miller, L.V., Krebs, N.F. & Hambidge, K.M. Development of a compartmental model of human zinc metabolism: identifiability and multiple studies analyses. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **279**, R1671-1684 (2000).
133. Wastney, M.E. & House, W.A. Development of a Compartmental Model of Zinc Kinetics in Mice. *The Journal of Nutrition* **138**, 2148-2155 (2008).
134. Krebs, N.E. & Hambidge, K.M. Zinc metabolism and homeostasis: the application of tracer techniques to human zinc physiology. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **14**, 397-412 (2001).
135. Krebs, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* **130**, 1374S-1377S (2000).
136. Murakami, M. & Hirano, T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer science* **99**, 1515-1522 (2008).
137. Choudhury, H., Stedefor, T., Donohue, J., Ingermann, L., Osier, M., Fransen, M. & MacDonald, A.R. TOXICOLOGICAL REVIEW OF ZINC AND COMPOUNDS. *U. S. Environmental Protection Agency* (2005).
138. King, J.C., Shames, D.M. & Woodhouse, L.R. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* **130**, 1360S-1366S (2000).
139. Fitzpatrick, J.A., Andreko, S.K., Ernst, L.A., Waggoner, A.S., Ballou, B. & Bruchez, M.P. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. *Nano letters* **9**, 2736-2741 (2009).
140. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54-62 (2006).
141. Smedsrod, B., Le Couteur, D., Ikejima, K., Jaeschke, H., Kawada, N., Naito, M., Knolle, P., Nagy, L., Senoo, H., Vidal-Vanaclocha, F. & Yamaguchi, N. Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **29**, 490-501 (2009).
142. Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. & Yee, H. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS biology* **3**, e192 (2005).
143. Mackay, I.R. Hepatoimmunology: a perspective. *Immunology and cell biology* **80**, 36-44 (2002).
144. Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang, T., Tang, Y., Wang, H., Moul, X., Chen, Z. & Hel, N. Influence of nanoparticle shape, size, and surface

- functionalization on cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol* **13**, 6485-6498 (2013).
145. Fischer, H.C., Liu, L., Pang, K.S. & Chan, W.C.W. Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots: In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Advanced Functional Materials* **16**, 1299-1305 (2006).
 146. Conrad, M.E., Weintraub, L.R. & Crosby, W.H. The Role of the Intestine in Iron Kinetics. *The Journal of clinical investigation* **43**, 963-974 (1964).
 147. Weintraub, L.R., Demis, D.J., Conrad, M.E. & Crosby, W.H. Iron Excretion by the Skin. Selective Localization of Iron-59 in Epithelial Cells. *The American journal of pathology* **46**, 121-127 (1965).
 148. Andrews, N.C. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* **112**, 219-230 (2008).
 149. Sohlenius-Sternbeck, A.K. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. *Toxicol In Vitro* **20**, 1582-1586 (2006).
 150. Shi, H., He, X., Yuan, Y., Wang, K. & Liu, D. Nanoparticle-Based Biocompatible and Long-Life Marker for Lysosome Labeling and Tracking. *Anal. Chem.* **82**, 2213–2220 (2010).
 151. Yang, R.S., Chang, L.W., Wu, J.P., Tsai, M.H., Wang, H.J., Kuo, Y.C., Yeh, T.K., Yang, C.S. & Lin, P. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment. *Environmental health perspectives* **115**, 1339-1343 (2007).
 152. Hanaki, K.-i., Momo, A., Oku, T., Komoto, A., Maenosono, S., Yamaguchi, Y. & Yamamoto, K. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 496-501 (2003).
 153. Boldt, K., Bruns, O.T., Gaponik, N. & Eychmuller, A. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers. *The journal of physical chemistry. B* **110**, 1959-1963 (2006).
 154. Pi, Q.M., Zhang, W.J., Zhou, G.D., Liu, W. & Cao, Y. Degradation or excretion of quantum dots in mouse embryonic stem cells. *BMC biotechnology* **10**, 36 (2010).
 155. Su, Y., Peng, F., Jiang, Z., Zhong, Y., Lu, Y., Jiang, X., Huang, Q., Fan, C., Lee, S.T. & He, Y. In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. *Biomaterials* **32**, 5855-5862 (2011).
 156. Liu, N., Mu, Y., Chen, Y., Sun, H., Han, S., Wang, M., Wang, H., Li, Y., Xu, Q., Huang, P. & Sun, Z. Degradation of aqueous synthesized CdTe/ZnS quantum dots in mice: differential blood kinetics and biodistribution of cadmium and tellurium. *Particle and fibre toxicology* **10**, 37 (2013).
 157. Sperling, R.A. & Parak, W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical*

- transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **368**, 1333-1383 (2010).
158. Krpetic, Z., Anguissola, S., Garry, D., Kelly, P.M. & Dawson, K.A. Nanomaterials: impact on cells and cell organelles. *Advances in experimental medicine and biology* **811**, 135-156 (2014).
 159. Shohdy, K.S. & Alfaar, A.S. Nanoparticles targeting mechanisms in cancer therapy: current limitations and emerging solutions. *Ther Deliv* **4**, 1197-1209 (2013).
 160. Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A. & Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2050-2055 (2007).
 161. Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G.J. & Puntjes, V. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano* **4**, 3623-3632 (2010).
 162. Dell'Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T. & Linse, S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS one* **5**, e10949 (2010).
 163. Salvati, A., Pitek, A.S., Monopoli, M.P., Prapainop, K., Bombelli, F.B., Hristov, D.R., Kelly, P.M., Aberg, C., Mahon, E. & Dawson, K.A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature nanotechnology* **8**, 137-143 (2013).
 164. Rigopoulou, E.I., Roggenbuck, D., Smyk, D.S., Liaskos, C., Mytilinaiou, M.G., Feist, E., Conrad, K. & Bogdanos, D.P. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found. *Autoimmunity reviews* **12**, 260-269 (2012).
 165. Wang, F., Yu, L., Monopoli, M.P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A. & Dawson, K.A. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **9**, 1159-1168 (2013).
 166. Leng, X., Starchev, K. & Buffle, J. Adsorption of Fluorescent Dyes on Oxide Nanoparticles Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* **18**, 7602-7608 (2002).
 167. Brewer, S.H., Glomm, W.R., Johnson, M.C., Knag, M.K. & Franzen, S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir* **21**, 9303-9307 (2005).
 168. Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Rocker, C., Zhang, F., Parak, W.J. & Nienhaus, G.U. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **7 Suppl 1**, S5-S13 (2010).
 169. Baier, G., Costa, C., Zeller, A., Baumann, D., Sayer, C., Araujo, P.H., Mailander, V., Musyanovych, A. & Landfester, K. BSA adsorption on differently charged polystyrene nanoparticles using isothermal titration

- calorimetry and the influence on cellular uptake. *Macromolecular bioscience* **11**, 628-638 (2011).
170. Milani, S., Bombelli, F.B., Pitek, A.S., Dawson, K.A. & Radler, J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. *ACS nano* **6**, 2532-2541 (2012).
171. Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S.K. & Stauber, R.H. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology* **8**, 772-781 (2013).
172. Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmuller, A., Gordts, P.L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M. & Heeren, J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* **17**, 200-205 (2011).
173. Carneheim, C., Nedergaard, J. & Cannon, B. Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *The American journal of physiology* **246**, E327-333 (1984).
174. Carneheim, C., Nedergaard, J. & Cannon, B. Cold-induced beta-adrenergic recruitment of lipoprotein lipase in brown fat is due to increased transcription. *The American journal of physiology* **254**, E155-161 (1988).
175. 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* **80**, 576-584 (2002).

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
APC	Allophycocyanin
B ₀ , B ₁	Magnetfeld
BHWZ	Bluthalbwertszeit
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMT1	Divalenter Metalltransporter 1
EDC	<i>N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GKR	Ganzkörperretention
H	magnetische Feldstärke
H _c	Koerzitivfeldstärke
HAMCO	Hamburger Ganzkörperzähler
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCP1	<i>Heme Carrier Protein 1</i>
HOMO	<i>highest occupied molecule orbital</i>
I	Kernspinquantenzahl
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
i.v.	intravenös
KC	Kupffer cell
LPL	Lipoprotein Lipase
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cell</i>
LMWCr	<i>low-molecular-weight chromium-binding substance</i>
LUMO	<i>lowest unoccupied molecule orbital</i>
M	Magnetisierung

M _S , M _r	Sättigungsmagnetisierung, Remanenzmagnetisierung
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Metallothionein
NIRF	<i>near infra-red fluorescence</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ODA	Octadecylamin
ODE	1-Octadecen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDK	<i>PIP3 dependent kinase</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGS	PBS-Glycin-Saponin Puffer
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PMAOD	Poly(Maleinsäureanhydrid- <i>alt</i> -1-Octadecen)
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
QD	Quantum Dot
QY	<i>quantum yield</i>
RES	Retikuloendotheliales System
SA	Stearinsäure
SBB	<i>sodium borate buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
SLC	<i>solute-linked carrier</i>
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i>
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>
T _C , T _N	Curie-Temperatur, Neel-Temperatur
T ₁	longitudinale Relaxationszeit

T_2, T_2^*	transversale Relaxationszeit, effektive transversale Relaxationszeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TBP	Tri- <i>n</i> -butylphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TMAH	Tetramethylammonium Hydroxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
UV/Vis	ultraviolett/visible light
X	Suszeptibilität
z.B.	zum Beispiel
Zip	Zrt, Irt-ähnliches Protein
ZnT	Zinktransporter
ω_0	Larmorfrequenz

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Nanopartikeln.....	1
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Magnetisierung nach einem 90°-Puls und anschließende Relaxation.....	3
Abbildung 1.3: Darstellung der magnetischen Eigenschaften von Ferro-, Antiferro- und Ferrimagneten.....	5
Abbildung 1.4: Idealisierte Magnetisierungskurven	6
Abbildung 1.5: Darstellung des Größenquantisierungseffekts.....	11
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines multifunktionalen Nanopartikels.....	15
Abbildung 1.7: Vorgeschlagene Wirkungsorte für Chromodulin (Pfeile) in der Insulinsignalkaskade.....	17
Abbildung 1.8: Positionen einiger Zinktransporter in einer generalisierten Zelle.....	18
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Transportwege von Eisen.....	20
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Ganzkörperzählers.....	28
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Radiomarkierung von SPIOs mit ^{51}Cr	36
Abbildung 3.2: Verpackung von Nanokristallen in PMAOD.....	37
Abbildung 3.3: SEC von, mit ^{51}Cr -markierten, SPIOs.....	38
Abbildung 3.4: Untersuchung der Stabilität von ^{51}Cr -markierten SPIOs bei Inkubation mit Salzsäure (Endkonzentration 0,1 M).....	39
Abbildung 3.5: Organverteilung von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ nach 2 h.....	40
Abbildung 3.6: Organverteilung von ^{51}Cr -SPIOs und $^{51}\text{CrCl}_3$ nach 4 w	42
Abbildung 3.7: Ganzkörperretention und Exkretion von ^{51}Cr	43
Abbildung 3.8: Pharmakokinetische Modelle.....	44
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Prozessierung von polymerverpackten SPIOs.....	45
Abbildung 3.10: Ganzkörperretention von ^{59}Fe -SPIOs bzw. $^{59}\text{FeCl}_3$	46
Abbildung 3.11: Postsynthetische Radiomarkierung von CdSe/CdS/ZnS QDs.....	49

Abbildung 3.12: Überprüfung des Einbaus von ^{65}Zn in QDs.....	49
Abbildung 3.13: Untersuchung der Stabilität von ^{65}Zn -markierten QDs	51
Abbildung 3.14: Charakterisierung radiomarkierter CdSe/CdS/ZnS QDs.....	52
Abbildung 3.15: Fällung der Partikel und Lokalisierung der Radioaktivität zwischen Pellet und Überstand.....	53
Abbildung 3.16: Filtration von radiomarkierten, polymerverpackten QDs und Lokalisierung der Radioaktivität.....	54
Abbildung 3.17: Absorptionsspektren von nicht radiomarkierten und radiomarkierten Mn:ZnSe QDs.....	55
Abbildung 3.18: Organverteilung von ^{65}Zn -QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach 2 h.....	56
Abbildung 3.19: Kompartimentmodell zur Veranschaulichung des Zinkmetabolismus von Menschen.....	57
Abbildung 3.20: Organverteilung von ^{65}Zn -QDs und $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach 4 w	58
Abbildung 3.21: Ganzkörperretention von ^{65}Zn -QDs bzw. $^{65}\text{ZnCl}_2$ nach i.v. Injektion.....	59
Abbildung 3.22: Struktur der Leber und Aufteilung der Zellzahlen.....	60
Abbildung 3.23: Ganzkörperretention und Prozentuale Organverteilung von ^{59}Fe nach Gabe von ^{59}Fe -SPIOs bei mit Clodronat behandelten und Kontrollmäusen.....	62
Abbildung 3.24 Präparation von murinen, primären Hepatozyten.....	63
Abbildung 3.25: Verteilung der ^{59}Fe -Aktivität innerhalb der Leber nach Gabe polymerumhüllter SPIOs.....	64
Abbildung 3.26: Konfokale Mikroskopie eines Kryoschnitts einer Mausleber 2 h nach i.v. Injektion von polymerverpackten QDs	65
Abbildung 3.27: Isolation von SPIO-markierten Zellen in einem Magnetfeld....	66
Abbildung 3.28: Isolation nicht-parenchymaler Zellen nach Gabe von polymerumhüllten SPIOs.....	67
Abbildung 3.29: Kolokalisation von QDs und Lysosomen.....	69
Abbildung 3.30: Schematische Darstellung eines funktionalisierten SPIOs.....	71
Abbildung 3.31: Agarosegele und SEC von gekoppelten Nanopartikeln.....	72
Abbildung 3.32: Konfokale <i>Laser-Scanning</i> Mikroskopie von Kryoschnitten von Mauslebern 2 h nach i.v. Injektion unterschiedlich modifizierter QDs.....	73

Abbildung 3.33: α ML-12-Zellen wurden für 3 h mit mTf-QDs bzw. ungekoppelten QDs inkubiert und direkt im Anschluss fixiert.....	75
Abbildung 3.34: SEC doppelt radiomarkierter SPIOs.....	76
Abbildung 3.35: BHWZ und Organverteilung doppeltmarkierter mTf-SPIOs....	77
Abbildung 3.36: Radiomarkierte SPIOs, eingebettet in ein Lipoprotein.....	79
Abbildung 3.37: Verteilung der ^{59}Fe -Aktivität innerhalb der Leber nach Gabe von in TRL eingebetteten SPIOs.....	80

6.4 Chemikalien

Substanz	GHS-Hinweis	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	Gefahr	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Borsäure	Gefahr	360FD	201, 308+313
Chloroform	Achtung	302+332, 315, 319, 336, 351, 361d, 373	261, 281, 305+351+338
EDC	Gefahr	314	280, 305+351+338, 310
EDTA	Achtung	319	305+351+338
Essigsäure	Gefahr	226, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Ethanol	Gefahr	225, 302, 371	210, 260
Isopropanol	Gefahr	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Kupfersulfat	Achtung	302, 315, 319, 410	273, 305+351+338, 501
Methanol	Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 260, 280, 301+310, 311
1-Octadecen	Gefahr	304	301+310, 331
Octadecylamin	Achtung	315, 319, 335	261, 305+351+338
Paraformaldehyd	Achtung	228, 302+332, 315, 317, 319, 335, 351	280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313, 370+378
Salpetersäure 65%	Gefahr	272, 314	220, 280, 305+351+338, 310
Salzsäure 5M	Achtung	290, 315, 319, 335	261, 305+351+338
SDS	Gefahr	228, 302, 311, 315, 318, 335	210, 261, 280, 305+351+338, 312
TBP	Gefahr	226, 250, 302, 312, 314	222, 231, 280, 305+351+338, 310, 422
TMAH	Gefahr	225, 301+311+331, 315, 318, 370	210, 260, 280, 301+310, 305+351+338, 311
Toluol	Gefahr	225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 261, 281, 301+310, 331
Triton X-100	Achtung	302, 319, 411	273, 305+351+338

6.5 Sicherheits- und Gefahrenhinweise

H200-Reihe: Physikalische Gefahren

- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.

H400-Reihe: Umweltgefahren

- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P200-Reihe: Prävention

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P210 Von Hitze/ Funken/ offener Flamme/ heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.

P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.

P231 Unter inertem Gas handhaben.

P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P300-Reihe: Reaktion

P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P331 Kein Erbrechen herbeiführen.

P301+P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301+P330+P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.

P302+P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P304+P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P305+P351+P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P308+P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P370+P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.

P400-Reihe: Aufbewahrung

P422 Inhalt in/ unter ... aufbewahren.

P500-Reihe: Entsorgung

P501 Inhalt/ Behälter ... zuführen.

6.6 Danksagung

Zunächst möchte ich PD Dr. Dr. **Peter Nielsen** herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Betreuung während der gesamten Arbeit danken. Prof. Dr. Dr. **Horst Weller** danke ich ebenfalls für die gute Betreuung als 2. Gutachter meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr **Alexander Eychmüller** für die Kooperation. Für die gute Zusammenarbeit mit **Christian Waurisch**, **Gordon Stachowski** und **Christoph Bauer**, bei der Bereitstellung und Synthese von Quantum Dots möchte ich ebenfalls danken. Auch **Sunhild Salmen** bin ich zu Dank verpflichtet für die unermüdliche Versorgung mit SPIOs.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. **Barbara Freund** bedanken, die mich in die Welt der Nanopartikel eingeführt hat. Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. **Jörg Heeren** für die konstruktiven Gespräche und Dr. **Markus Heine** für die großartige Hilfestellung und immerwährende Unterstützung. Für die einzigartige Hilfsbereitschaft im Labor danke ich **Sandra Ehret**, **Rosemarie Kongi**, **Angelika Schmidt**, **Birgit Henkel**, **Eva-Marie Azzizi** und **Walter Tauscher**. Auch **Leah Eissing**, **Brigitte Müller**, **Clara John**, **Kristina Gottschling**, **Kirstin Albers** und **Artur Giemsa** möchte ich an dieser Stelle für die unentwegte Hilfestellung danken. Für die wunderbare Atmosphäre im Schlauch und natürlich auch den fachlichen Rat möchte ich **Lucia Krott**, **Anna Worthmann** und **Gabriella Gébel** herzlich danken.

Ich bedanke mich überdies bei der guten Seele des Instituts, **Christine Runge**, bei **Dieter Münch-Harrach** für sämtliche Hilfestellung bei Technikfragen und auch Dr. **Klaus Tödter**.

Ebenso geht mein Dank an das Schwerpunktprogramm **SPP1313** der DFG für die Bereitstellung von Personal- und Reisemitteln.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir ermöglicht hat, diesen akademischen Weg einzuschlagen und natürlich Oliver, der bei dem einen oder anderen Rückschlag darum gekämpft hat, mein Selbstvertrauen wieder aufzubauen.

6.7 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

6.8 Eidesstattliche 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 26.05.2014

Denise Bargheer