

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin

Direktor Prof. Dr. Dr. Andreas Guse

Untersuchung zum Vroman-Effekt der Proteincorona von PEGylierten, superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Julius Nielsen
aus Hamburg

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 30.06.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Harald Ittrich

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. <i>Eisenoxidnanopartikel</i>	6
1.2 <i>Quantum Dots</i>	10
1.3 <i>Nanomedizin</i>	12
1.3.1 <i>Anwendungen</i>	12
1.3.2 <i>Schicksal von Nanopartikeln in vivo</i>	15
2. Fragestellung	22
3. Materialien und Methoden	23
3.1. <i>Nanopartikel</i>	23
3.2. <i>Herstellung der PMAcOD-SPIOs</i>	23
3.3. <i>PEGylierung mit Polyethylenglykolen</i>	24
3.4. <i>Radioaktivität und Sicherheit</i>	24
3.5. <i>Messungen am Hamburger Ganzkörper-Counter (HAMCO)</i>	25
3.7. <i>¹²⁵I-Markierung von Testproteinen</i>	26
3.8. <i>Inkubation mit Testproteinen</i>	27
3.9. <i>FPLC mit Gelchromatographiesäulen</i>	27
3.10. <i>Gelektrophorese</i>	28
3.11. <i>Eisen- und Proteinbestimmung</i>	28
3.12. <i>Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS)</i>	29
3.13. <i>Tierversuche</i>	29

4. Ergebnisse	31
4.1. Polymerverpackung von SPIOs	31
4.1.1 Standardprozedur mit Ultraschall	31
4.1.2. Verpackung von SPIOs ohne Ultraschall.....	35
4.2. Modifizierung der Polymerhülle von SPIOs	38
4.2.1. Reaktion mit Fluoreszeinamin und Polyethylenimin (PEI)	38
4.2.2 PEGylierung mit Methoxy-PEG	41
4.2.3. Pegylierung mit Amino-PEG	44
4.3. Versuche zur Stabilität einer Proteincorona in vitro.....	46
4.4. Intravenöse Injektion von PEGylierten SPIOs in Mäusen	50
5. Diskussion und Ausblick.....	52
6. Zusammenfassung/Summary	57
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Anhang (DLS Tabellen).....	62
9. Literatur	65
10. Danksagung	73
11. Lebenslauf.....	74
12. Eidesstattliche Versicherung	75

1. Einleitung

Nanopartikel (synonym: Nanocluster, Nanokristall; nano von lateinisch „*nanus*“ oder griech. „*nanos*“ = Zwerg, zwerghaft) sind im engeren Sinn mikroskopisch kleine Partikel mit einer Dimension zwischen 1 und 100 nm (1 nm = 10^{-9} m), wobei dieser Größenbereich oft nach oben erweitert wird. Sie können aus verschiedenen Materialien synthetisiert werden und bestehen häufig aus einem Kernmaterial, das mit einer Hüllstruktur nach außen hin funktionalisiert werden kann. Häufig verwendete Kernmaterialien sind Metalle (z.B. Gold, Silber, Eisen), Metall- und Halbmetall-Oxide (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , ZnO, Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2), Halbleiter wie Cadmiumtellurid (CdTe), Cadmiumselenid (CdSe) („Quantum Dots“) oder Kohlenstoff (z.B. „*Carbon black*“, Fullerene und Nanoröhren), sowie Polymere wie Dendrimere oder Liposome (Abb. 1.1) (Dykman et al. 2011, Zhang et al. 2016), Gupta et al. 2005, Weller 2003, De Volder et al. 2013).

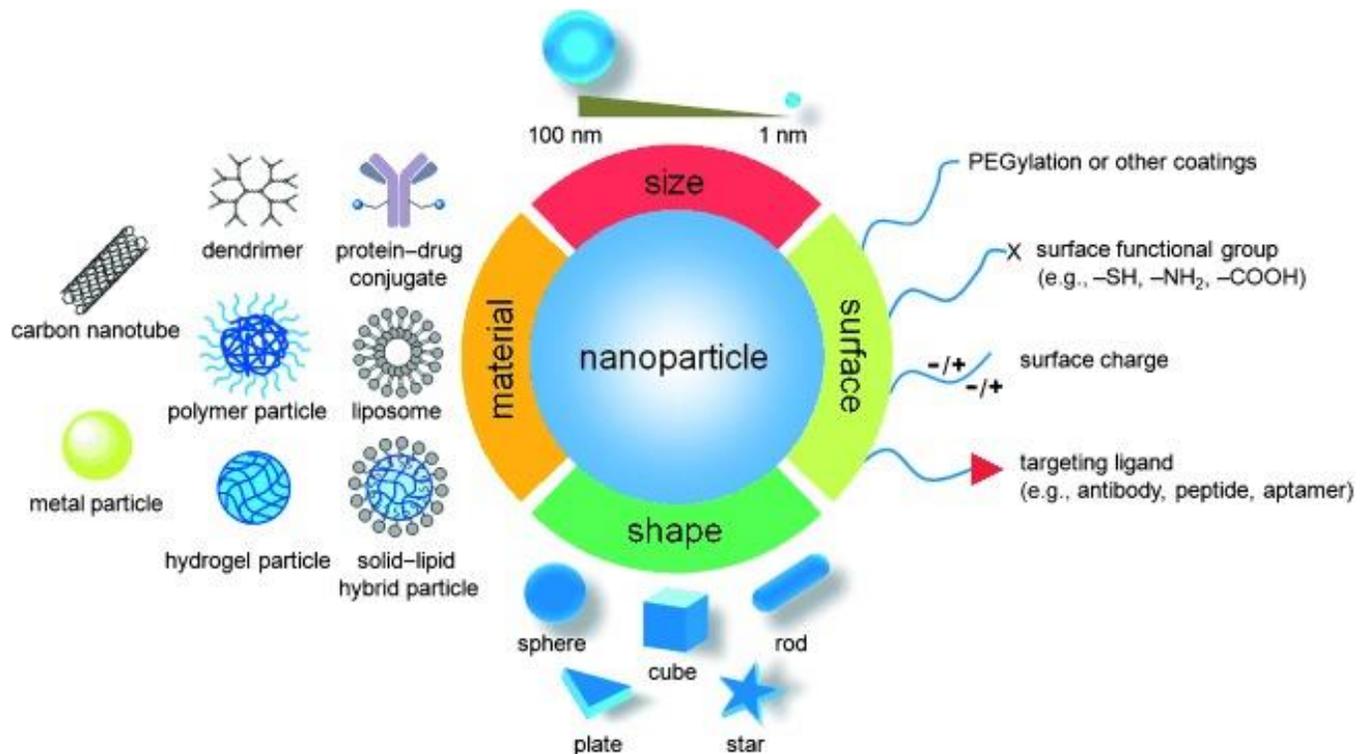


Abbildung 1.1: Grundsätzlicher Aufbau und mögliche Funktionalisierungen von Nanopartikeln (Graphik entnommen aus Sun et al. 2014).

Nanopartikel sind interessant, weil sie durch ihre sehr kleine Struktur ein außergewöhnlich hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen haben. Dadurch zeigen sie andere chemische und physikalische Eigenschaften als entsprechend zusammengesetzte Festkörper und größere Partikel. So spielen Massenanziehungskräfte zwischen den kleinen Partikeln eine kleine Rolle, während aufgrund der großen spezifischen Oberfläche der Einfluss der Oberflächenkräfte (z. B. van-der-Waals-Kraft) und der Oberflächenladung zunehmen. Dies führt zu einer anderen, meist höheren chemischen Reaktivität der Nanopartikel, was auch Einfluss auf deren Toxizität haben kann (Rivera Gil et al. 2010).

In einem visionären Vortrag sagte Richard Feynman 1960 eine direkte Manipulation auf atomarer Ebene als effektivere Form der chemischen Synthese voraus, die auch zur Schaffung neuer Materialeigenschaften führen könnte (Feynman 1960). Diese Konzeption wurde anfangs wenig beachtet und erst später als Geburtsstunde der Nanotechnologie bezeichnet, wohl auch weil Feynman inzwischen (1965) mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

Nanopartikel finden sich heute bereits in vielen täglichen Anwendungen (Kessler 2011, www.nano-technologien.com 2012). Beispiele sind Leseköpfe in Festplatten, Titandioxid als UV-Filter in Sonnencremes, Quantum Dots in hochauflösenden Displays, „Carbon black“ in Autoreifen, Liposomen in „*Anti-Aging*“ Produkten. Im Fassadenputz, auf Dachziegeln, wo sie das Wachstum von Algen verhindern sollen, in wasserabweisenden Textilien, Farben und Lacken, in Waschmitteln sowie in Pflegeprodukten wie Deodorants und Zahnpasten sind Nanopartikel enthalten. Im Folgenden wird kurz auf zwei wichtige Nanopartikel-Arten eingegangen, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden: **Eisenoxid-Nanopartikel** und **Quantum Dots**.

1.1. Eisenoxidnanopartikel

Nanopartikel aus Eisenoxid verfügen über besondere magnetische Eigenschaften, die sie für die Magnetresonanztomographie (MRT) interessant machen, der mit Abstand wichtigsten apparativ-diagnostischen Untersuchungsmethode in der Humanmedizin (Stark et al. 1988, Chertok et al. 2008, Li et al. 2018, Uchiyama et al. 2015). Die magnetischen Eigenschaften sind abhängig von der Teilchengröße der Partikel (Lu et al. 2007). Größere Partikel bestehen aus verschiedenen Bereichen gleicher Magnetisierungsrichtung, den so genannten Weißschen Bezirken, welche energieminiert ausgerichtet sind. Typischerweise sind diese Domänen ca. 100 nm groß, im Fall von Ferrit 128 nm. Bei einmaligem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes richten sich die Weißschen Bezirke danach aus und es entsteht ein Ferromagnet, da die Ausrichtung nach Abschalten des Feldes bestehen bleibt (Hystere). Ist das Eisenoxid- Partikel aber genügend klein, so besteht es nur aus einer Domäne und es kommt zum Superparamagnetismus („superparamagnetic iron oxide particles =SPIOs“). Hierbei besteht der Magnetismus nur beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes, ohne verbleibenden Restmagnetismus nach Abschalten des äußeren Feldes.

Die magnetischen Eigenschaften der SPIOs sind also sehr stark von ihrer Größe und ihrer Kristallinität abhängig, deswegen müssen diese Parameter in der Synthese genau eingestellt werden (Liu et al. 2015, Xie et al. 2018). Es gibt eine Reihe von kommerziell erhältlichen MRT-Kontrastmitteln, die eisenoxid-basiert sind wie Endorem®, Feridex®, Resovist® oder Sinerem® (Ferrucci et al. 1990, Wang 2011). Die besten Ergebnisse in Bezug auf Reproduzierbarkeit, hohe Kristallinität und geringe Größenvariation (=“monodispers“) werden in der sogenannten Hochtemperatursynthese erreicht, wenn sich organometallische Precursor in hochsiedenden unpolaren Lösungsmitteln zersetzen oder Metallsalze unter diesen Bedingungen reduziert werden (Wang 2011, Sun und Zeng 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten SPIOs mit einem Kerndurchmesser von 11 nm wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Weller, Uni-Hamburg, auf diesem Wege hergestellt (Yu et al. 2004, Hyeon et al. 2001).

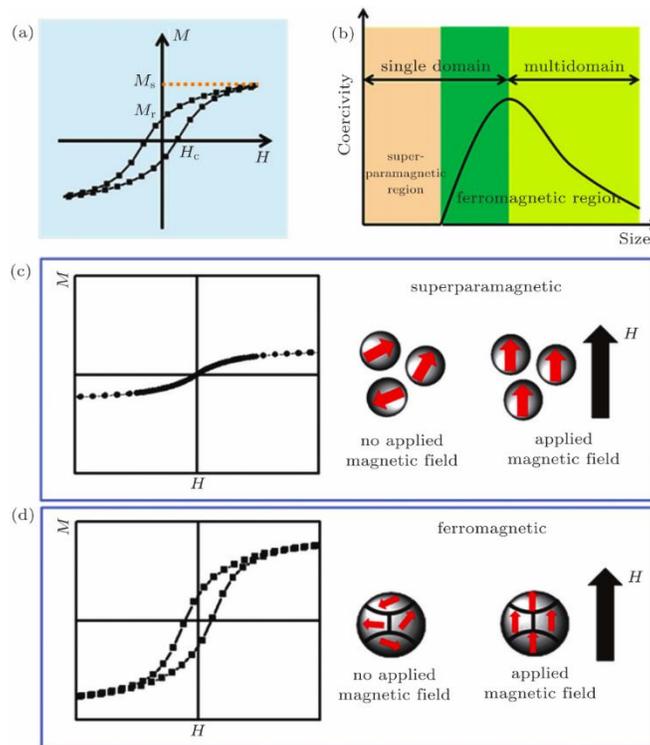


Abbildung 1.2: Darstellung der magnetischen Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Größe. a) Hysteresekurven für große Partikel, M_r = Remanenz. b) Abhängigkeit der Koerzitivfeldstärke (H_c) vom Partikeldurchmesser, c) Verhalten von SPIOs im magnetischen Feld, d) Verhalten von ferromagnetischen Partikeln im MRT (Liu et al. 2015).

Auf Grund ihrer besonderen magnetischen Eigenschaften können SPIOs als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet werden.

Das Prinzip der MRT-Bildgebung beruht darauf, dass ein homogenes, externes Magnetfeld auf die Protonen in einem Gewebe einwirkt. Es kommt zu einer Präzision der Spins um die Richtung des Magnetfeldes (z) mit einer Rotation in der Lamorfrequenz (ω_0) (Abb. 1.3). Die Spins können in zwei möglichen Ausrichtungen vorliegen. Durch das Magnetfeld wird die Entartung der beiden Zustände aufgehoben, wobei die günstigere Ausrichtung entlang des Magnetfeldes energetisch herabgesetzt und die ungünstigere heraufgesetzt wird, sodass es zu einer unterschiedlichen Besetzung zwischen den beiden Niveaus kommt.

Durch das Einstrahlen eines Radiosignals in der Lamorfrequenz werden die Spins in die transversale (x,y) Richtung ausgelenkt. Bei der Rückkehr in den

Ausgangszustand treten zwei unterschiedliche Relaxationsprozesse auf, die abhängig von der jeweiligen Umgebung sind.

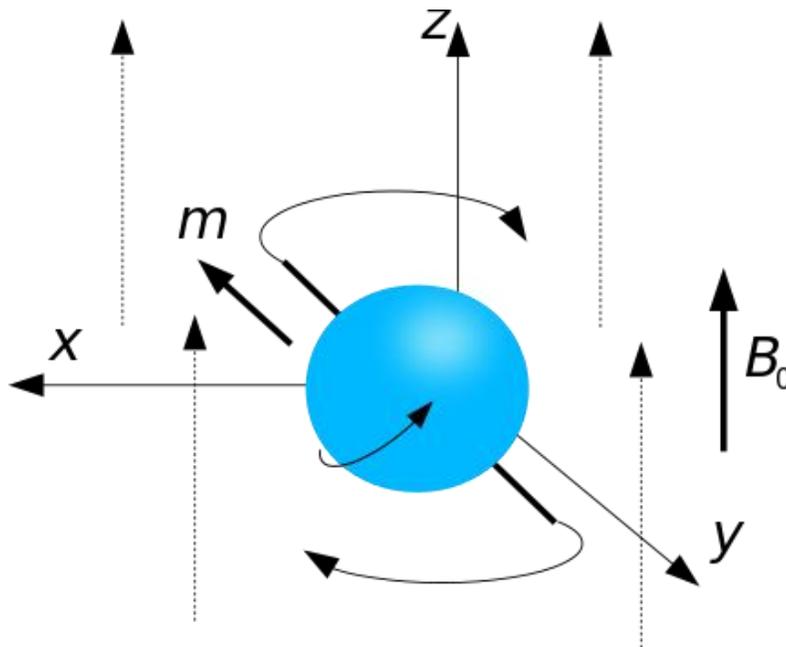


Abbildung 1.3: Prinzip der Magnetresonanz. Protonen haben einen Eigendrehimpuls (Spin) und dadurch ein magnetisches Dipolmoment. In einem stationären starken Magnetfeld (B_0) wirkt auf die Spins ein Drehmoment ein, das sie in Richtung einer parallelen Anordnung ausrichten will. Wegen des Eigendrehimpuls gelingt dies aber nicht, sondern es kommt zu einer Präzessionsbewegung um die z-Achse mit einer für den Kern typischen Resonanzfrequenz. Bei der MR-Messung wird senkrecht zu B_0 (x-Achse) genau diese Resonanzfrequenz pulsartig eingestrahlt und die Wirkung auf die Spins beobachtet, die abhängig von der unmittelbaren lokalen Umgebung sind. Literatur: Franz Wilhelmstötter, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30497621>

Bei der longitudinalen (T_1 -) Relaxation, auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet, findet ein Energietransfer an die Umgebung (Gitter) statt. Dadurch wird die Boltzmann-Verteilung wieder hergestellt. Die Dephasierung der Spins erfolgt ohne Energieabgabe und resultiert in einem Verlust der transversalen Magnetisierung. Diese wird als transversale oder Spin-Spin-Relaxation bezeichnet. Hierbei spielen zwei Aspekte eine Rolle, die eigentliche transversale Relaxationszeit (T_2) und die effektive transversale Relaxationszeit (T_2^*), die für die lokalen Inhomogenitäten des Magnetfeldes verantwortlich sind. Beide Relaxationen führen zu einem

Signalverlust in der Detektorspule und können so gemessen werden. Durch das Anlegen eines Magnetfeldgradienten kann die Larmofrequenz ortsabhängig moduliert werden, wodurch man eine Ortsauflösung erreicht. Gewebe haben in Abhängigkeit von Wasser-, Fett- und Eisengehalt, sowie der Viskosität, unterschiedliche Relaxationszeiten und erscheinen dadurch in der MRT-Aufnahme unterschiedlich hell (Stark et al. 1988, Li et al. 2018, Akbarzadek et al. 2012).

Außer bei sehr kleinen Partikeln haben SPIOs einen größeren Einfluss auf die transversale Relaxationszeit (T_2), die sie verkürzen. Dadurch sinkt die Signalintensität und das Bild erscheint dunkler (siehe Abbildung 1.4). Daher wirken übliche SPIOs als negative Kontrastmittel (Akbarzadek et al. 2012). Positive Kontrastmittel verkürzen vor allem die T_1 –Relaxationszeit mit moderater Wirkung auf die T_2 -Relaxationszeit. Das ist z.B. bei Gadoliniumkomplexen der Fall oder auch bei sehr kleinen SPIOs mit hydrodynamischen Durchmessern von ca. 10 nm (Tromsdorf et al. 2009). Solche Ultrasmall-SPIOs können evtl. zukünftig die Gd-Kontrastmittel ersetzen, die potentiell toxisch sind, vor allem bei niereninsuffizienten Patienten.

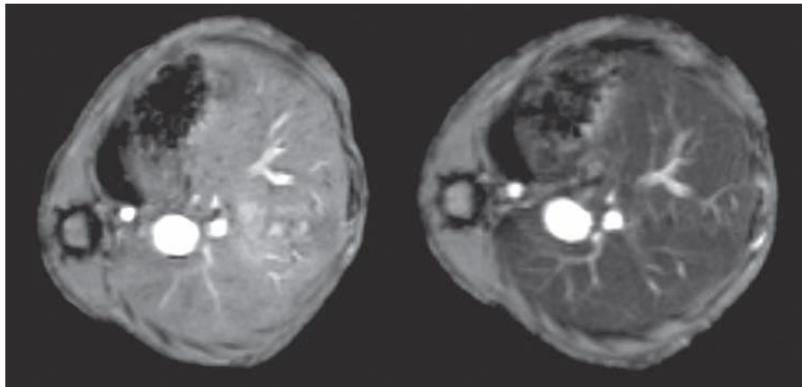


Abbildung 1.4: MRT-Bild der Leber einer Maus vor (links) und nach (rechts) der Gabe eines negativen Kontrastmittels (Abbildung entnommen aus Bruns et al. 2009).

SPIOs werden im Körper vor allem von Makrophagen des Monozyten-Makrophagen-Systems (frühere Bezeichnung „retikuloendotheliales System , RES)

in Leber und Milz aufgenommen (Stark et al. 1988, Bruns et al. 2009). Anwendungen von SPIOs als Kontrastmittel sind vor allem die Auffindung von Leberläsionen, da z.B. Tumorgewebe die Partikel anders aufnehmen als natives Lebergewebe (Zhu et al. 2017). Auch in anderen Tumoren kann es zu einer unspezifischen Anreicherung in Makrophagen kommen, was zur Bildgebung genutzt werden kann (Bruns et al. 2009, Zhu et al. 2017, Gholami et al. 2019, Cardoso et al. 2018). Zukünftige Entwicklungen gehen in die Richtung einer spezifischen Anreicherung in Zielzellen, indem die Partikel durch Anheftung von Antikörpern, Nanobodies, Lektinen oder Aptameren entsprechend funktionalisiert werden (Perez-Herrero et al. 2015, Liu et al. 2016).

1.2 Quantum Dots

Bei Halbleiterkristallen mit sehr kleiner Partikelgröße bewirkt eine Lichteinstrahlung eine intensive Fluoreszenz, die technisch breite Anwendungsmöglichkeiten gefunden hat, z.B. bei modernen, hochauflösenden TV-Displays. Bei entsprechenden Partikeln mit einer Größe < 100 nm kommt es zu einer energetischen Aufspaltung der Bänder in diskrete gequantelte Niveaus, weshalb sie als Quantum Dots bezeichnet werden. Dabei entsteht eine Bandlücke zwischen dem Leitungs- und dem Valenzband. Wenn es nun zu einer optischen oder elektrischen Anregung des Halbleiters kommt, wird ein Elektron vom Valenzband ins Leitungsband gehoben und lässt im Valenzband eine Lücke zurück. Bei der Rekombination von Elektron und Lücke wird die dabei freiwerdende Energie als Lichtquant abgegeben. Die Wellenlänge des ausgesendeten Lichtes hängt vom Material und der Größe der Bandlücke ab. Die Größe der Lücke ist von der Größe des QDs abhängig. Je größer das Teilchen, desto kleiner die Bandlücke und desto langwelliger das ausgesandte Licht (siehe Abbildung 1.5) (Rosetti et al. 1983, Pisanic et al. 2014, Lee et al. 2016).

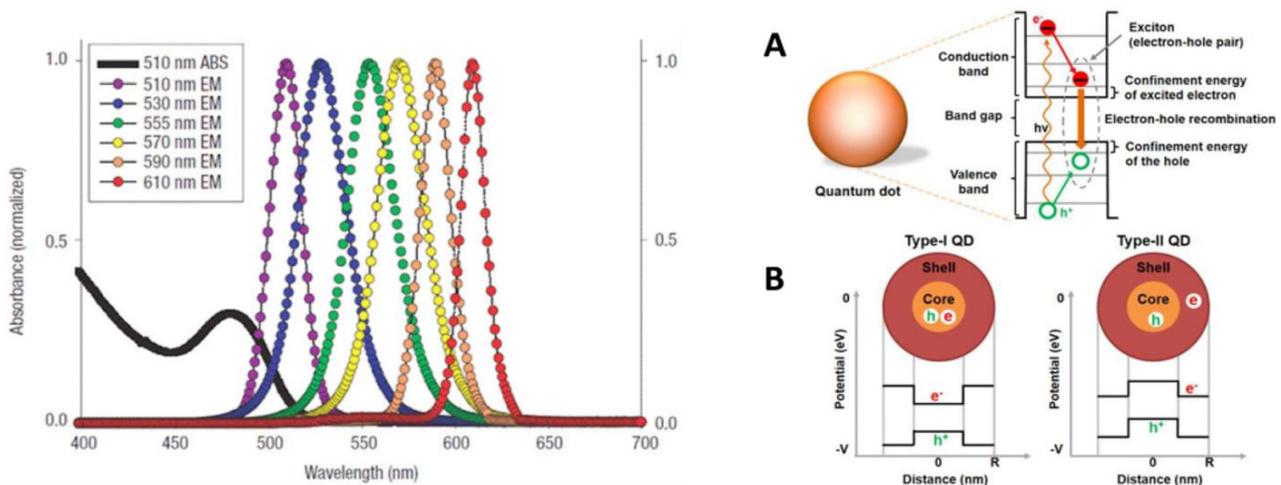


Abbildung 1.5: Links, Absorption und Emission von sechs CdSe-Quantum Dots unterschiedlicher Größe. Rechts, A, Rekombination der Elektronen-Bandlücke, B, Energieniveau Diagramm von Typ I und Typ II Qdots (aus Pisanic et al. 2014).

Die ersten QDs wurden hergestellt, indem Cadmium mit Sulfiden gemischt wurde (Bera et al. 2010).

Moderne Varianten bestehen heute aus einem CdSe-Kern, der von einer CdS-Schale umgeben und einer weiteren ZnS-Schicht überzogen ist (Core-Shell-Shell-Partikel), die deutlich stabiler sind (Pisanic et al. 2014, Lee et al. 2016).

Im Gegensatz zu den organischen Farbstoffen zeichnen sich die QDs durch eine höhere Photostabilität, eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer und einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten aus. Ihre Emissionsspektren sind gaußförmig und von deutlich geringerer Spektralbreite als die der organischen Farbstoffe, während ihre Absorptionsspektren sehr breit sind (Weller 2003, Rosetti et al. 1983, Pisanic et al. 2014, Lee et al. 2016). Diese Eigenschaften machen sie zu attraktiven Kandidaten auch für das Fluoreszenz imaging im Körper. Qdots könnten z.B. an Biomoleküle gekoppelt und durch die Fluoreszenz die Verteilung und/oder Anreicherung verfolgt werden. Allerdings enthalten QDs toxische Schwermetalle wie Cd, Hg oder Pb, die bei Speicherung mehr oder weniger schnell

freigesetzt werden könnten, sodass erhebliche Bedenken hinsichtlich der Anwendung beim Menschen bestehen (Sharma et al. 2017).

1.3 Nanomedizin

Unter dem Begriff „Nanomedizin“ wird die medizinische Anwendung der Nanotechnologie in Diagnostik, Pathophysiologie, Therapie etc. erfasst (Bobo et al. 2016, Baptista et al. 2018, de Lazaro et al. 2021). Nanomedizinische Anwendungen sind heute bereits eines der wichtigsten Felder der Nanotechnologie und erbringen Umsätze von mehr als 130 Milliarden Dollar/Jahr, bis 2025 werden 360 Milliarden erwartet (Research and Markets 2017: Nanomedicine Market Analysis By Products). Nanomedizin meint die medizinische Applikation von Nanomaterialien in Diagnostik und Therapie, aber auch die Entwicklung von nanoelektronischen Biosensoren. Ein wichtiges aktuelles Forschungsinteresse ist, die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit biologischen Systemen im Detail zu verstehen, deren Toxizität und die Umweltbelastung zu erfassen und möglichst zu minimieren (Sharma et al. 2017, Nel et al. 2009, Albanese et al. 2012).

1.3.1 Anwendungen

Eine Hauptvision der Nanomedizin ist die Herstellung von funktionalisierten Nanopartikeln, die über spezifische Liganden (z.B. Antikörper, Nanobodies, Aptamere) ihr gewünschtes Ziel gerichtet finden können (Abb. 2) (Pietersz et al. 2017). Ziele können grundsätzlich alle normalen oder krankhaft veränderten Zellarten und Geweben sein, die spezifische Oberflächenmarker oder spezifische Aufnahmemechanismen aufweisen. Ein spezielles Target wäre das Gehirn, das durch eine effektive Blut-Hirn-Schranke geschützt ist. Spezifische Aufnahmemechanismen lassen nur eine Versorgung mit lebenswichtigen Substanzen zu (Abb. 1.6) (Abbott et al. 2006). Diese restriktive Blut-Hirnschranke ist ein wesentlicher Hemmfaktor für die Entwicklung einer wirksamen Therapie gegen viele psychiatrische oder neurodegenerative Erkrankungen, indem viele Medikamente dadurch wirkungslos werden. (Pandey et al. 2015). So geht man

heute davon aus, dass mehr als 98 % aller niedermolekularen Verbindungen die Blut-Hirnschranke nicht passieren können (Nair et al. 2016).

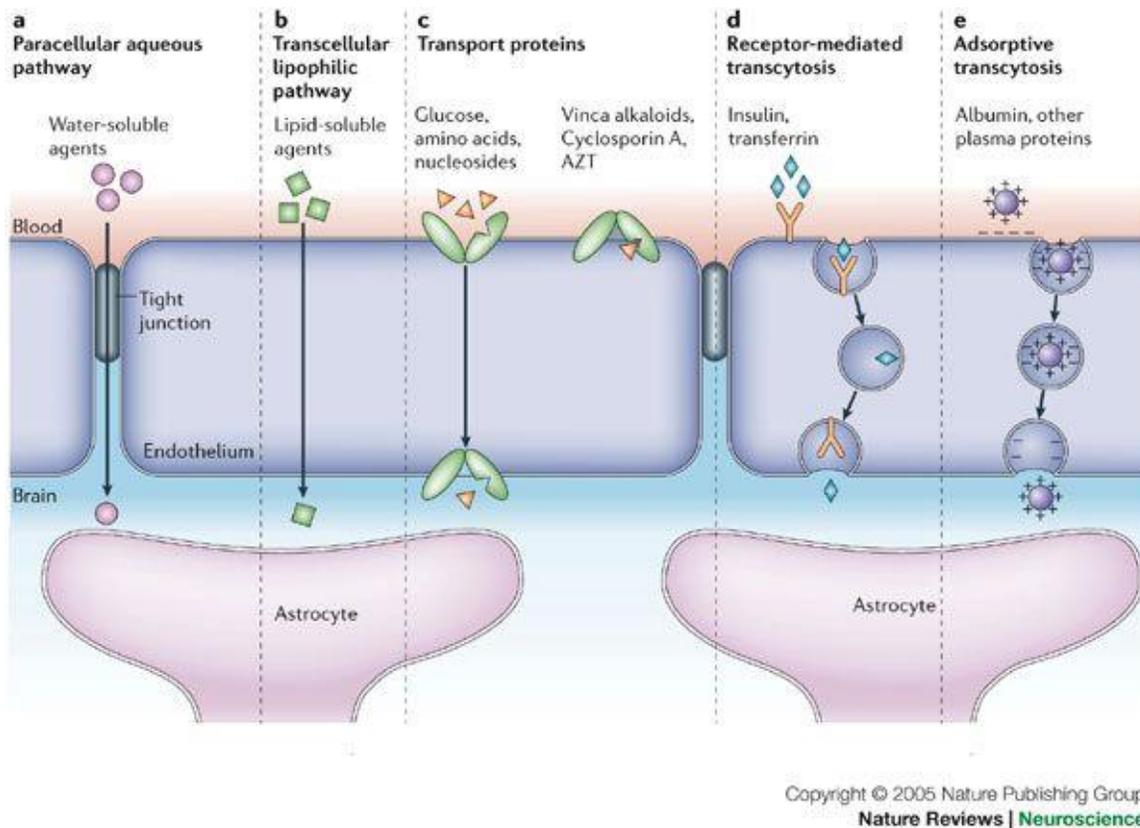


Abbildung 1.6.: Mögliche Transportwege durch die Blut-Hirnschranke, die im Wesentlichen durch Endothelzellen gebildet wird. a.) wasserlösliche Substanzen inkl. polare Agentien werden schlecht durchgelassen; b.) lipophile Substanzen gelangen durch Diffusion wesentlich besser ins Gehirn; c-e, für verschiedene physiologische Zucker, Aminosäure, Pure und Proteine gibt es spezifische Aufnahmewege. (Entnommen aus Abbott et al. 2006).

Eine Vision der Nanomedizin wäre, dies ändern zu können, um dadurch eine neue Ära der pharmakologischen Therapie bei Hirnkrankheiten einzuläuten (Nair et al. 2016, Saraiva et al. 2016, Spuch et al. 2012, Fond et al. 2013, Pardridge et al. 2006). Dies zielt ausdrücklich auch auf neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson und Schlaganfälle. Alles Krankheiten, die bei höherer Lebenserwartung immer häufiger werden, viel menschliches Leid mit sich bringen und das Gesundheitssystem auch finanziell belasten (Fond et al. 2013).

Im Gesamtorganismus können funktionalisierte Nanopartikel sowohl für Diagnostik als auch Therapie eingesetzt werden. Es handelt sich dabei vor allem um sogenannte „drug delivery Systeme“, die pharmazeutisch wirksame Substanzen besser an den Zielort bringen können. Dadurch wird die Absorption, die Verteilung und die Elimination des Wirkstoffes so verändert, dass die Wirksamkeit optimiert und Nebenwirkungen minimiert werden können. Eines der ersten Beispiele ist das 2005 in den USA, 2008 auch in Europa zugelassene Nanodevice **Abraxan**® für die Behandlung von metastasierendem Brustkrebs. Bei dieser Medikamentenformulierung handelt es sich um das lange bekannte Chemotherapeutikum *Paclitaxel*, das an 130 nm große Albuminnanopartikel gebunden wurde. Durch die Bindung an Albumin wird das lipophile Medikament wasserlöslich, so dass auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann. **Abraxane**® ist deutlich effektiver und hat weniger Nebenwirkungen als andere Formulierungen von Paclitaxel (Gradishar 2006, Stainthorpe 2018). Es gibt inzwischen weitere Anwendungen von Albumin-basierten Nanocarriersystemen. So kann das sehr effektive, aber auch sehr cardiotoxische Doxorubicin durch ein solches System bei verschiedenen Krebserkrankungen evtl. effektiver verwendet werden (Kanwal et al. 2018).

Eine andere, heute schon erfolgreiche Anwendung sind MRT-Kontrastmittel, die eisenoxid-basiert sind und in 1.1 bereits diskutiert wurden. Hier hofft man zukünftig auf funktionalisierte SPIOs, die über spezifische Liganden ein „targeted imaging“ möglich machen können, um z.B. Tumore oder arteriosklerotische Plaques frühzeitig zu erkennen (Stark et al. 1988, Palekar et al. 2015, Zhu et al. 2017, Wu et al. 2020).

In Machbarkeitsstudien sind viele dieser patentierten Konzepte ausprobiert worden, was die Euphorie um Nanopartikel in der Medizin weiter stimuliert hat (Bobo et al. 2016). Allerdings sind inzwischen auch grundsätzliche Probleme erkannt worden, die auf eine Lösung warten, bevor die „Revolution“ tatsächlich auf breiter Front wirklich stattfinden kann (Juliano 2013). Dazu gehören z.B. Fragen der Effektivität von Nanopartikeln in der „Theranostik“ und der Fragen zur *in-vivo* -Toxizität von

Nanopartikeln.

1.3.2 Schicksal von Nanopartikeln in vivo

Bioverteilung und Metabolismus

Es gibt viele *in vitro* Untersuchungen, wie Nanopartikel mit Proteinen und Zellen interagieren, wie sie in Zellen aufgenommen werden und welche Reaktionen sie dann auslösen können (Nel et al. 2009, Albanese et al. 2012, Dobrovolskaia et al. 2008, Wang et al. 2011). In Tierversuchen sind auch viele Pilotversuche publiziert worden, vor allem mit dem Ziel, spezielle Targets im Körper spezifisch zu erreichen. Bis heute sind durchgreifende Erfolge eher rar gesät, schon weil das *in vivo*-System sich offenbar wesentlich komplexer darstellt, als gut standardisierbare *in vitro*-Versuche. Intravenös injizierte, hochreaktive Nanopartikel werden im Blutstrom sofort verwirbelt und treffen auf eine Vielzahl von Plasmaproteinen und auf die riesigen Oberflächen von Blutzellen und Gefäßendothelzellen. Was da genau passiert, ist bisher wenig bekannt und kann auch methodisch relativ schwer erfasst werden.

Trotzdem sind natürlich genaue Erkenntnisse über die Halbwertszeit, die Bioverteilung, den Metabolismus und die Exkretion unerlässlich z.B. für die Zulassung eines Nanopartikels als Medikament oder diagnostisches Tool. Darüber hinaus sind diese Informationen wichtige Aspekte in der Nutzen-Risiko-Bewertung einer neuartigen Therapie. Dabei müssen Effekte von Nanopartikeln *in vivo* vor allem quantitativ erfasst werden (Feliu et al. 2016). Traditionell ist dafür die radioaktive Markierung in der Biochemie der sensitivste Weg, um quantitative Ergebnisse über das Verhalten eines markierbaren Moleküls oder Partikels *in vivo* zu erlangen. Exemplarisch wurde das mit ⁵⁹Fe-markierten SPIOs in Mäusen durchgeführt (Abb. 1.4) (Freund et al. 2012).

In Hinblick auf eine umwelttoxikologische Exposition von Nanopartikeln sind eine orale, dermale oder pulmonale Aufnahmeroute denkbar. Grundsätzlich können Nanopartikel auf allen diesen Wegen aufgenommen werden, doch ist die Effektivität der Aufnahme nach allen bisherigen Erfahrungen wohl nur sehr gering.

Die Bolus-Injektion in eine periphere Vene dürfte für die meisten nanomedizinischen Anwendungen die häufigste Anwendungsrouten zu sein. Nach der intravenösen (i.v.) Injektion würde der Blutfluss die NPs in das rechte Herz, durch die Lungenkapillaren, zurück zum linken Herzen und dann in das arterielle System, das jedes Organ mit den jeweiligen NPs versorgt, verbreiten. Unter diesen Bedingungen wird eine Hauptblutfraktion in die Leber und die Milz eindringen, die eine riesige Fähigkeit haben, xenobiotische NPs aus dem Blutstrom zu entfernen.

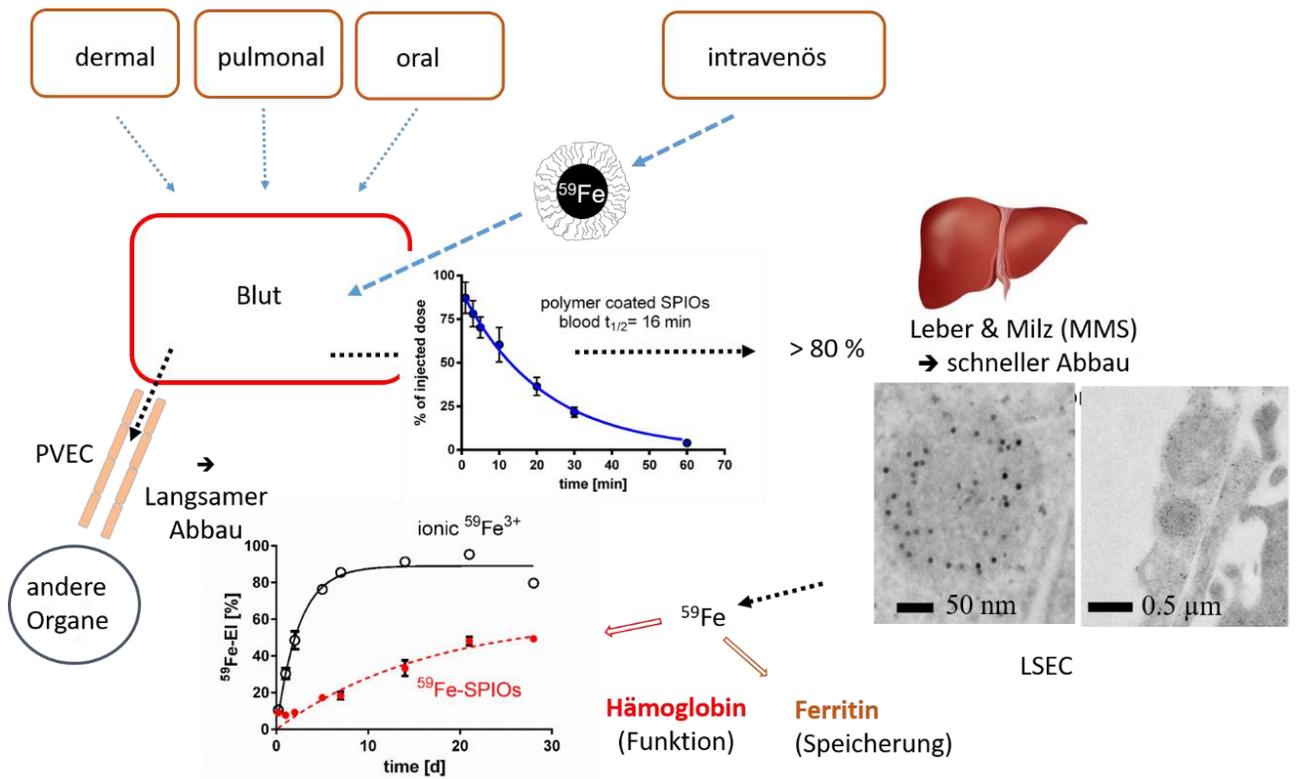


Abbildung 1.7: Verteilung und Abbau von intravenös applizierten ^{59}Fe -markierten Eisenoxid- NPs in Mäusen. Die FeOx NPs waren monodisperse Eisenoxidkerne (11 nm Durchmesser), die mit einem amphiphilen Polymer, Poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) zu einem 25 nm negativ geladenem SPIOs verpackt wurden. Eine große Fraktion der NPs wird innerhalb von wenigen Minuten in Kupferzellen und Lebersinusendothelzellen (LSEC) aufgenommen. Der Abbau der FeOx -Kerne kann sehr gut verfolgt werden, weil dann freigesetztes ^{59}Fe in das Hämoglobin von neugebildeten Erythrozyten (^{59}Fe -EI) eingebaut wird. Der Abbau von NPs außerhalb von Leber und Milz (MMS-System) geht deutlich langsamer (modifiziert nach Felio et al. 2016, Frey et al. 2019).

Einige Studien haben die Verteilung der markierten NPs quantifiziert und es kann erwartet werden, dass ein großer Anteil der meisten Protein-bedeckten NPs innerhalb von Minuten nach der Injektion aufgenommen wird (siehe Abb. 1.7) (Lynch und Dawson 2008, Kaufman et al. 2007, Walkey et al. 2012, Tenzer et al. 2013, Docter et al. 2014). Ein anderer Zelltyp, der an der effizienten Aufnahme von NPs in vivo beteiligt ist, sind Endothelzellen, welche die Venen, Arterien und Kapillaren im ganzen Körper auskleiden (Cao 2018).

Proteincoronabildung

Bei Eintritt in eine biologische Umgebung wird die Oberfläche fast aller Arten von Nanopartikeln sofort von unterschiedlichsten Biomolekülen besetzt. Diese bilden eine Corona individueller Zusammensetzung, die wahrscheinlich einen wesentlich größeren Einfluss auf die Distribution, Metabolisierung und Biokompatibilität der Partikel hat als deren physikochemische Eigenschaften selbst.

Detaillierte Studien zu dieser Adsorption führten zu der Etablierung des Konzepts von „Hard-“ und „Soft Corona“ durch die Arbeitsgruppe um K. A. Dawson (Lynch und Dawson 2008). Die Hard Corona wird als direkt und (nahezu) irreversibel gebundene Hülle angesehen. Die äußere Soft Corona dagegen ist weniger fest (reversibel) gebunden und befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit der Umgebung (Abb. 1.8).

Eine mehr thermodynamische Betrachtung geht auf Walkey und Chan zurück (Walkey und Chan 2012). Danach ist die Proteinadsorption an einer Oberfläche ein dynamischer Effekt, bei dem die Proteine kontinuierlich adsorbiert und desorbiert werden. Die Assoziations- bzw. Desorptionsraten eines Proteins an ein Nanomaterial werden durch die Parameter k_{on} und k_{off} beschrieben. Der Wert k_{on} ist von der Häufigkeit des Kontaktes zwischen dem bestimmten Protein und des NPs abhängig, sowie von der Wahrscheinlichkeit, dass ein solcher Kontakt zu einer Adsorption führt.

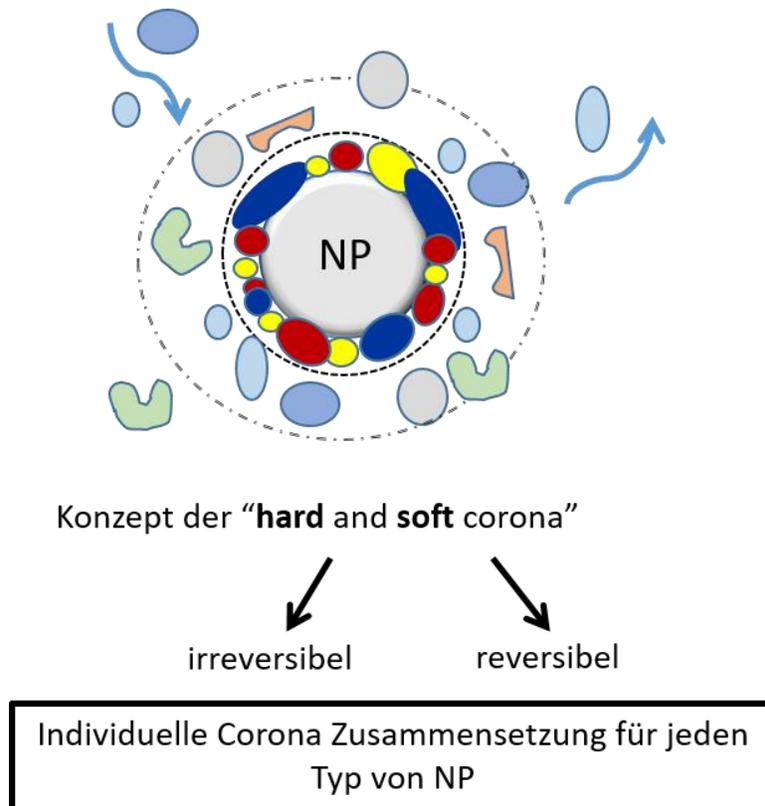


Abbildung 1.8: Konzept der Hard- und Softcorona nach Lynch und Dawson (modifiziert nach Lynch und Dawson 2008). Der Erstkontakt einer nativen NP-Oberfläche mit Proteinen führt zu einer **Hardcorona**, die fest haften bleibt. Darum orientieren sich weitere Proteine, die in einer **Softcorona** weniger fest gebunden sind und einer intensiven Austauschdynamik unterworfen sind.

Zu jeder Zeit kann ein Protein desorbieren, was anderen Proteinen erlaubt, selbst mit der NP-Oberfläche zu interagieren. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung der Proteinkorona, die aus Desorption / Adsorption resultieren, werden als "Vroman-Effekt" (Vroman 1962) bezeichnet. Leo Vroman ging von einem Zusammenspiel zwischen kinetischer und thermodynamischer Kontrolle aus: kleinere Proteine diffundieren schneller an die Oberfläche, größere haben eine stärkere Anziehungskraft und dominieren letztlich das Gleichgewicht. Durch diesen Effekt kann sich die Identität der adsorbierten Proteine mit der Zeit ändern, auch wenn die Gesamtmenge des adsorbierten Proteins konstant bleibt (Angeloti-Uberti et al.

2018). Während der anfänglichen Bildung der Proteinkorona werden vorwiegend Proteine mit der höchsten Assoziationsrate adsorbiert. Haben diese Proteine aber eine kurze Verweildauer, so werden sie durch Proteine ersetzt, die langsamere Assoziationsraten, aber höhere Verweilzeiten haben. Während der Plasmaproteinadsorption kann man den Vroman-Effekt in "frühe" und "späte" Phasen aufteilen, wobei der Frühzustand ein Übergangszustand ist und der späte Zustand stationär ist. Es gibt inzwischen viele Untersuchungen zur Zusammensetzung einer Proteinkorona, die unter *in vitro* Bedingung z.B. durch Inkubation mit Plasmaproteinen erzeugt wurden. Dabei werden zwar einige Plasmaproteine häufig wieder gefunden, die im Plasma eine hohe Konzentration und/oder Affinität aufweisen. Darunter finden sich vor allem Proteine, die *in vivo* die Funktion haben, große Partikel zu umhüllen, um sie z.B. zu markieren (Obsonine). Grundsätzlich hat aber offenbar jedes NP seine eigene Proteinkorona, die von Größe, Ladung, Form etc. der Partikel abhängt (Tenzer et al. 2013, Docter et al. 2014). Dies weist grundsätzlich auf die Frage hin, wie realistisch solche Versuche die *in-vivo* Situation wiedergeben können. Wahrscheinlich ist, dass die Proteinkoronabildung eines gegebenen Nanopartikels in einer nanomedizinischen Anwendung ganz entscheidend für die Bioverteilung *in vivo* sein wird (Liu et al. 2020, Garcia Vence et al. 2020).

PEGylierung von Nanopartikeln

Polyethylenglykole (PEG) sind synthetische Polymerisationsprodukte von Ethylenglykol mit Molekulargewichten (MW) von einigen 100 Da bis zu mehreren 10000 Da. Kleinkettige PEGs sind sehr gut wasserlöslich, mit Zunahme der MW nimmt die Löslichkeit ab (Karakoti et al. 2011).

PEG ist wenig reaktionsfähig und wenig toxisch, sodass besonders in der pharmazeutischen Herstellung von Medikamenten und Diagnostika die sogenannte PEGylierung eine wichtige Rolle spielt (Karakoti et al. 2011). Dabei werden kettenförmige Strukturen an den Wirkstoff angehängt, die diesen nahezu vollständig umhüllen und somit gegen den vorzeitigen Abbau durch Antikörper oder körpereigene Enzyme schützen. Durch PEGylierung wird die Immunogenität einer

Substanz vermindert und die Halbwertszeit in vivo meist deutlich verlängert. Pegasys® ist ein PEGyliertes α -Interferon zur Behandlung von Hepatitis C. Mircera® ist ein PEGyliertes Erythropoetin (EPO) der 3. Generation und damit ein „Continuous Erythropoiesis Receptor Activator“ (CERA) (Piotr et al. 2017). Um eine spezifische, maßgeschneiderte Oberfläche der Nanopartikel zu erschaffen, können eine Reihe von Polymeren verwendet werden. Durch die Umhüllung der Partikel kann die Oberflächenchemie modifiziert werden. So ist es möglich, die Löslichkeit sowie die Oberflächenladung der Partikel gezielt zu verändern. Im Falle von funktionalisiertem Polymer können auch Liganden an der Oberfläche gebunden werden (Abb. 1.9).

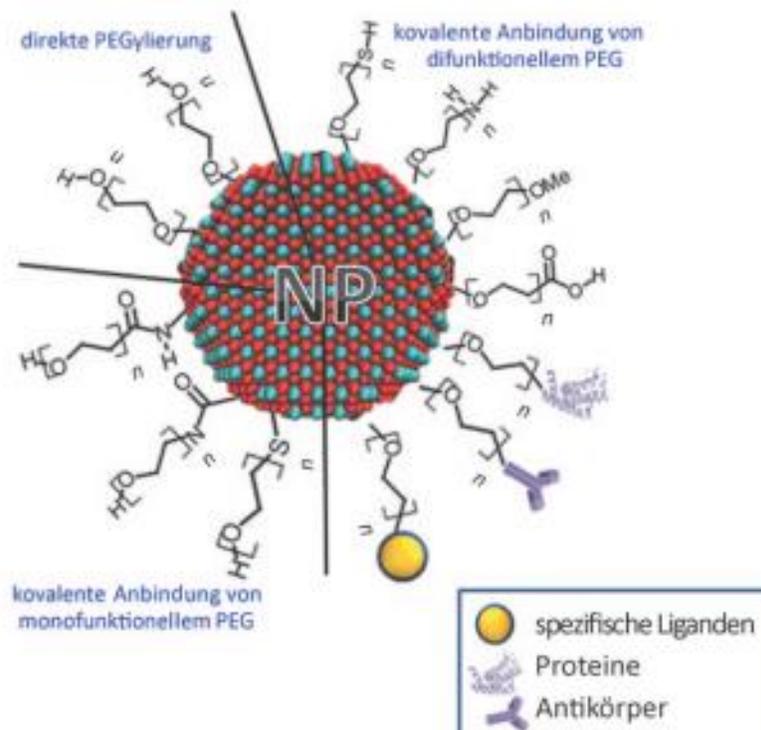


Abbildung 1.9: Verschiedene Strategien für die PEGylierung von Nanopartikeln. Alle Strategien führen zu Nanopartikeln, die wasserlöslich sind und Opsonin-Proteine besser abweisen. Monofunktionalisierte PEGs können dazu verwendet werden, kovalente Bindungen zwischen PEG-Molekülen und den NPs zu knüpfen, was zu einer hohen Langzeit- und Dispersionsstabilität führt. An bifunktionalisierte PEG-Moleküle können freie Endgruppen kovalent an andere Polymere, Fluoreszenzsonden oder Proteine (z.B. Antikörper) gebunden werden (modifiziert nach Karakoti et al. 2011).

Die endständigen OH-Gruppen können z.B. durch Oxidation in verschiedene

Endgruppen verändert werden (Abb. 1.10). Die PEGylierung von Nanopartikeln lässt sich durch verschiedene Methoden erreichen. Die PEG-Moleküle können durch direkte Adsorption an der Oberfläche der Nanopartikel oder durch kovalente Reaktion an die Nanopartikeloberfläche gebunden werden (Karakoti et al. 2011). Bifunktionalisierte PEGs eröffnen dabei die Optionen, spezifische Liganden, Proteine und Antikörper an die Partikel zu binden. Liganden mit Carboxyl- oder Aminfunktionen können in verschiedenen Medien mit unterschiedlichem pH-Wert zu einer positiv oder negativ geladenen Oberfläche der Nanopartikel führen.

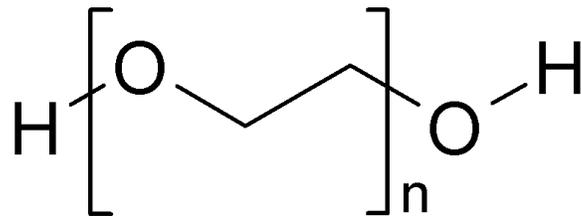


Abbildung 1.10: Struktur von Polyethylenglycol

Die PEGylierte Oberfläche verringert die nichtspezifische Wechselwirkung mit Opsonin-Proteinen und vermindert so die rasche Aufnahme durch das Retikuläre Endothelsystem (RES) (Behzadi et al. 2017). Die Zirkulationszeit im Blut wird erhöht, weshalb targeted-Nanopartikel eine verbesserte Chance erhalten, ihr Zielorgan zu erreichen. Insgesamt verbessert die PEGylierung die Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit der Partikel und verringert die enzymatische Zersetzung. Allerdings deuten sich auch Probleme mit einer Immunogenität von PEGylierten Nanopartikeln an, sodass auch nach PEG-Alternativen gesucht wird (Hoang et al.).

2. Fragestellung

Oberflächeneigenschaften eines Nanopartikels wie Größe, Ladung, Hydrophilie, kolloidale Stabilität etc. sind entscheidend für das unmittelbare Schicksal eines Partikels *in vivo*. Plasmaproteine können sich z.B. anlagern und damit großen Einfluss auf die Verteilung und die Zellaufnahme nehmen.

In der vorliegenden Arbeit sollte das in der Arbeitsgruppe häufig verwendete SPIOs mit einer Hülle aus Poly(maleinsäureanhydrid-alt-1-octadecen)-Polymer durch Reaktion mit verschiedenen Aminen modifiziert werden, um möglichst gezielt Einfluss auf die oben genannten Eigenschaften zu nehmen. Dabei bietet sich vor allem die Reaktion mit mono- oder bifunktionellen Polyethylenglykolen (PEG) an, um die Reaktivität der Teilchen in Hinblick auf eine Proteincoronabildung zu verändern.

Ausgehend von einer solchen Plattform an SPIOs mit modifizierter Oberflächencharakteristik sollten dann *in vitro* Versuche mit ¹²⁵I-markierten Testproteinen (Albumin, Transferrin) durchgeführt werden, um die Bindung und die ggf. Verdrängung von Proteinen an (aus) einer artifiziellen Proteincorona zu untersuchen.

Ziel war damit auch, den spezifischen Vroman-Effekt bei dem in der Arbeitsgruppe häufig verwendeten SPIOs zu charakterisieren.

3. Materialien und Methoden

3.1. Nanopartikel

Die hier verwendeten Nanopartikel waren mit Ölsäure stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit einer Core-Größe von 4-18 nm, sowie core-shell-shell (CdSe-CdS, ZnS) 636 nm Quantum Dots. Die Quantum Dots und die 11 nm SPIOs wurden von der Arbeitsgruppe Prof Weller, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg bezogen und waren in hochsiedenden Lösungsmitteln nach Literaturmethoden hergestellt worden (Hyeon et al. 2001, Yu et al. 2004). Grundsätzlich wurde dabei Eisenoxid (FeOOH) mit einem Überschuss an Ölsäure in 1-Octadecene als Lösungsmittel auf 320°C unter Stickstoff erhitzt und 80 min auf dieser Temperatur gehalten. Abkühlung bringt dann die Kondensation von ölsäurestabilisierten monodispersen Eisenoxid-Kernen. Die in den in vitro Versuchen hauptsächlich verwendeten 11 nm Kerne stammten aus einer Charge von Sunhild Salmen (AG Weller). Die Partikel dieser Charge wiesen in der Transmission-Elektron-Mikroskopie (TEM) eine enge Größenverteilung ($< 10\%$ Standardabweichung) auf. Kleinere (4 nm) oder größere SPIOs (18 nm) wurden von der CAN (Centrum für angewandte Nanotechnologie) Hamburg bezogen.

3.2. Herstellung der PMAcOD-SPIOs

Um die monodispersen hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikel wasserlöslich zu machen, wurden sie mit dem Poly(maleinsäureanhydrid-alt-1-octadecen)-Polymer nach der Methode von Shtykova et.al. 2008 umkapselt (Shtykova et al. 2008, Freund et.al. 2012). Dazu wurden 200 μl NP-Lösung mit einem NP-Gehalt von 2 mg Trockengewicht mit 1,8 ml Chloroform und 2 ml PMAcOD-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Chloroform mit Stickstoffstrom abgedampft und der Rückstand in 3,0 ml 20% TBE-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde insgesamt 3 mal für 10 Minuten lang (Abkühlpause dazwischen von 10 min) sonifiziert, um das Polymer ausreichend für jeden Kern fein zu verteilen und um einer Agglomeratbildung entgegenzuwirken. Anschließend wurde 10 Minuten bei 60°C auf den Schüttler inkubiert. Bei den folgenden dreimaligen zehnmütigen

Zentrifugationen (5000 UPM, 2200g, RT) der meist homogenen Lösungen wurde der Überstand nach jedem Schritt in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das jeweils gebildete Pellet verworfen. Die Abtrennung von überschüssigem Polymer erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UPM (ca.123000 g), 4° C, 1 Stunde. Abschließend wurde der Überstand möglichst vollständig abpipetiert und das Pellet in ca. 200 µl PBS aufgenommen. Abschließend wurde die NP-Lösung durch Millex-HV Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

3.3. PEGylierung mit Polyethylenglykolen

Die für die PEGylierung der PMAcOD umhüllten SPIOs α -Methoxy- ω -amino-PEG (C-PEG) mit einem Molekulargewicht von 5000 Da und α,ω -Bis-amino-PEG (N-PEG) mit einem Molekulargewicht von 10000 wurden von der Fa. Rapp Polymere (Tübingen) bezogen. Die Inkubationsansätze enthielten 1 mM PEG (Methoxy-PEG-Amine 5000D oder α,ω -Bisamino PEG 10000D und verschiedene Konzentrationen an frisch hergestelltem EDC, um ein definiertes Verhältnis SPIOs:EDC von 1:200 bis 1:40000 einzustellen (Pellegrino et al. 2004). Die Ansätze wurden in Eppendorfgefäßen über Nacht bei Raumtemperatur gerollt, der Überschuss an EDC und freiem PEG wurde durch wiederholte Filtration in 10000 Da Filter Units (Pall Filter-systems GmbH, Crailsheim, Germany) und Aufnahme in SBB jeweils entfernt.

3.4. Radioaktivität und Sicherheit

Vor der Aufnahme der Laborarbeit erfolgte eine Einweisung in Strahlenschutz durch den Strahlenschutzbeauftragten Prof. Dr. Jörg Heeren. Wichtige Regelung beim Umgang mit radioaktiven Substanzen ist das sogenannte „ALARA-Prinzip“ („as low as reasonably achievable“). Dies bedeutet, dass man mit möglichst geringer Strahlenbelastung so kurz wie möglich arbeitet. Die Arbeiten mit ^{125}I - bzw. ^{59}Fe -markierten Substanzen fanden ausschließlich in den dafür zugelassenen Räumen der Ab-

teilung statt. Während der Arbeiten mit radioaktiven Substanzen wurden Schutzkitel, eine Schutzbrille sowie Handschuhe verwendet. Sämtliche γ -strahlende (^{59}Fe) radioaktiven Substanzen wurden hinter einem Bleischutz inkubiert. Der anfallende Müll wurde getrennt gesammelt und nach dem Zerfall (Halbwertszeit ^{59}Fe = 44.5 d) nach Abklingen der Radioaktivität unter die Freigrenze entsorgt.

3.5. Messungen am Hamburger Ganzkörper-Counter (HAMCO)

^{59}Fe -haltige Proben wurden mit dem Hamburger-Ganzkörperzähler gemessen (Braunfurth et al. 1977). Dies ist ein großvolumiger und zugleich sensitiver Radioaktivitätsdetektor mit quasi 4π -Messgeometrie, der ursprünglich für Menschen konzipiert war. Die jeweiligen γ -strahlenden Proben wurden in die Mitte des Gerätes positioniert. Die γ -Strahlen durchdringen dabei einen röhrenförmigen Tank gefüllt mit einem organischen Szintillator. Die γ -Strahlung bewirkt einen Comptoneffekt, bei dem Elektronen des Szintillatormoleküls angeregt werden. Dabei werden Lichtquanten freigesetzt, die von großflächigen NaJ-Detektoren aufgefangen und an die Elektronik des Systems weitergeleitet werden. Um den HAMCO von äußerer Strahlung effektiv abzuschirmen, ist er von einem 10 cm Stahlmantel umhüllt.

Vor jedem Messzyklus wurden eine Hintergrundmessung und eine Messung mit einem ^{59}Fe -Standard durchgeführt und damit die Apparatur geeicht. Die Proben wurden als punktförmige Quellen erfasst.

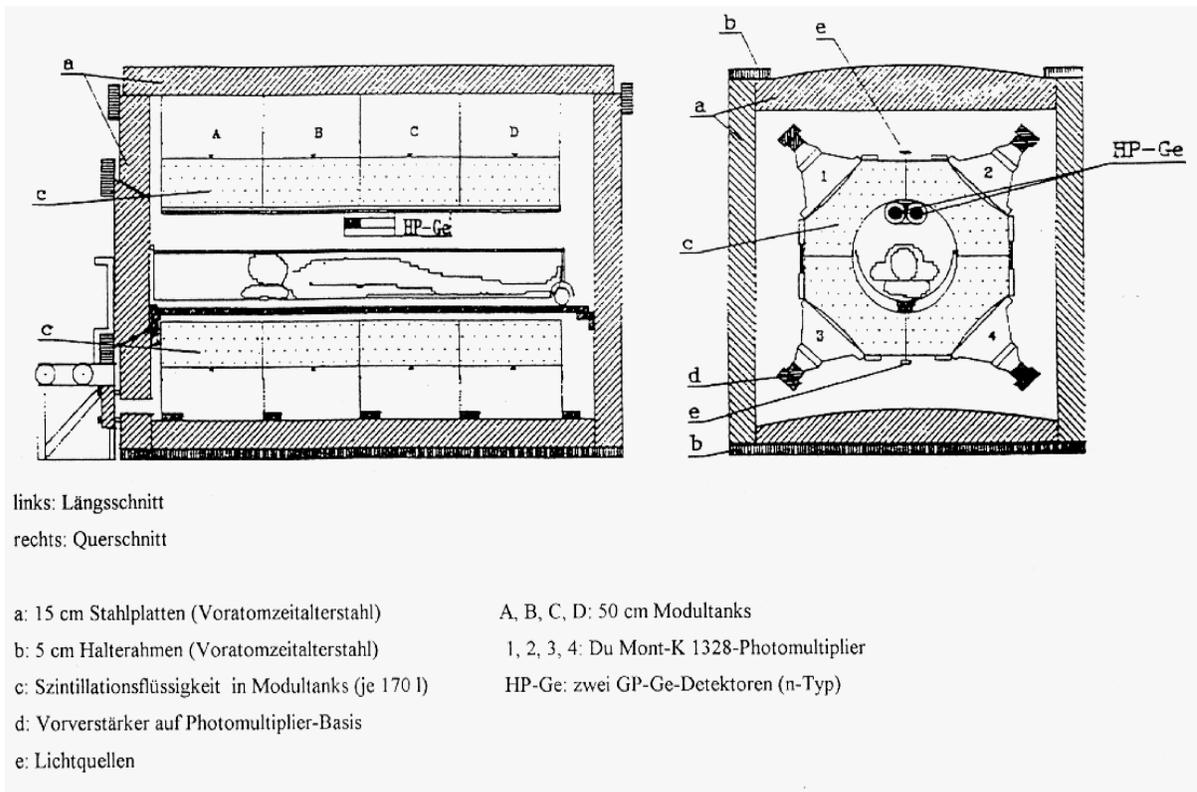


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau des Ganzkörperzählers (HAMCO) gemessen (Braunsfurth et al. 1977).

3.6. γ -Counter

Bei dem Wizard2 Gamma Counter handelt es sich ebenfalls um einen Szintillations-Detektor, der Natriumiodidkristalle enthält. Die durch β -Strahlung angeregten Natriumiodidkristalle setzen Lichtquanten frei, die durch die Photomultiplier detektiert und zu Spannungsimpulsen umgewandelt werden.

Die ^{125}I -Proben wurden jeweils 3 Minuten lang gemessen. In jeder Messreihe wurden eine geeichte Probe und eine Hintergrundprobe mitlaufen gelassen und die ermittelte Werte damit kalibriert.

3.7. ^{125}I -Markierung von Testproteinen

(Die radioaktive Synthese wurde von einem Radiochemiker der Abteilung (Dr. Nielsen) durchgeführt und zur Verfügung gestellt). 2–5 μL Aliquots von kommerziell erhältlicher ^{125}I -Natriumiodid Lösung in 0.1 M NaOH (20–50 μCi , Perkin-Elmer, Rodgau, Germany) wurden zu einer Lösung von 2 mg of humanem Transferrin (Sigma-

Aldrich, München, Germany) in 1 mL Natriumborat Puffer pH 9.0 (SBB) zusammen mit einem „iodination bead“ (Pierce, Rockford, USA) gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde auf eine PD10 Säule gegeben, die dann mit 1.8 mL of SBB gewaschen wurde. Das iodierte Protein wurde mit der Zugabe von weiteren 1.3 mL of SBB von der Säule eluiert. Die Lösung wurde auf die benötigte Konzentration von Protein durch Filtration (5000 D filter units) gebracht.

3.8. Inkubation mit Testproteinen

Die Inkubation von PEGylierten SPIOs mit ^{125}I -markiertem humanen Transferrin oder bovinem Albumin wurde mit oder ohne EDC durchgeführt. Dazu wurden gleiche Volumina an 6 μM SPIO Lösung und 600 μM ^{125}I -mTf in 50 mM SBB-Puffer pH 9.0 zusammenpipettiert. Für eine kovalente Bindung der Proteine wurde eine frisch hergestellte Lösung von EDC-Konzentration in SBB in einem Verhältnis SPIOs:EDC von 1:10.000 zupipettiert. Für die reine Adsorption wurde der reine SBB-Puffer zugesetzt. Die Ansätze in Eppendorfgefäßen wurden für 2 h bei RT inkubiert (Rollbrett) und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. EDC und ein Überschuss an nichtgebundenem freien Protein wurde mit einer 100 kDa „centrifugal filter unit“ bei 5000 UPM für 10 min zentrifugiert, und das Filterpellet 5 mal mit kaltem Puffer gewaschen.

3.9. FPLC mit Gelchromatographiesäulen

Für die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) wurde eine FPLC-Anlage (Pharmacia-Stockholm, Schweden) verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit einer Superose-6 10/300 GL Säule (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), die mit einem Elutionspuffer von 10 mM Tris(hydroxy-methyl)aminomethan, pH 8.0; 0.15 mM NaCl, 10 mM EDTA äquilibriert war. Es wurden jeweils 100 μl Probe aufgetragen und bei einer Flussrate von 0.5 mL/min unter UV Detektion bei 280 nm chromatographiert. Zu geeigneten Zeiten wurden Fraktionen von 0.5 ml aufgefangen und

anschließend auf ^{125}I bzw. ^{59}Fe detektiert. Die Säule wurde einmalig kalibriert, indem eine Probe von menschlichem Plasma aufgetragen wurde und gesammelte Fraktionen mit DLS auf die betreffenden Größen der Proteine gemessen. Die Reproduzierbarkeit der Trennung von proteinbeladenen SPIOs war sehr gut, exemplarische wiederholte Chromatographien von Ansätzen, die bei 4°C einige Tage gelagert wurden, waren praktisch identisch.

3.10. Gelelektrophorese

Der Grad der PEGylierung von SPIOs bzw. Qdots wurde mittels Agarose-Elektrophorese in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur überprüft. Die 1%ige (w/v) Agarose wurde mit Aqua dest. aufgekocht und nach kurzer Abkühlung in den Gel-Schlitten gegossen, der mit einem Kamm bestückt war.

Nach der Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel wurde mit 1x TBE Puffer überschichtet. 15 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 5 µl Ladungspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 45-60 Minuten. Das Gel wurde bei Normallicht (SPIOs, Eisenoxid=braune Farbe) oder im UV-Kasten (Qdots) fotografiert.

3.11. Eisen- und Proteinbestimmung

Eisenbestimmung. Je 200 µl einer Probe wurden in eine 96-Well-Microtiterplatte pipettiert. Der Standard wurde doppelt als Verdünnungsreihe in den folgenden Konzentrationen aufgetragen: 51,2, 25,6, 6,4, 1,6, 0,8 und 0,0 µg/ml. Als Leerwert wurde Aqua dest. verwendet. Im Anschluss wurden jeweils 50 µl 5 M HCl zugegeben und 30 Minuten lang bei 70° C auf einem Schüttler inkubiert, um die Eisenoxid-Nanoteilchen aufzuschließen. Nach der Abkühlung wurden aus jedem Well 50 µl in eine neue 96-Well-Platte überführt. Im Anschluss daran wurden jeweils 150 µl reduzierende Essigsäure/Acetat-Pufferlösung und 100 µl Bathophenanthrolin-Lösung zugegeben. Nach einer 15minütigen Inkubation auf RT wurde die Extinktion bei 540 nm auf einem ELISA-Reader (Amersham Biosciences, GE-Healthcare, München) gemessen. Die Extinktion des Standards wurde gegen die Konzentration aufgetragen, um die Geradengleichung zu erhalten.

Proteinbestimmung nach Lowry. Zu je 10 µl einer Probe wurden 40 µl 0,1 N NaOH pipettiert, danach wurden 500 µl Lösung C zugegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Lösung C wurde angesetzt mit einem Mischverhältnis zu 50/1 aus Lösung A und B. Im Anschluss wurden 50 µl Folinreagenz zugegeben und „gevortext“. Der Ansatz wurde danach bei RT im Dunkeln 30 Minuten inkubiert. Das Folinreagenz wurde angesetzt, in dem das Folin-Ciocalteau-Phenolreagenz mit einem Mischverhältnis von 1:2 mit Aqua dest. gemischt wurde. Je 300 µl der Ansätze wurden in ein 96-Well-Microtiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 750 nm an einem ELISA-Reader (Amersham Biosciences, GE-Healthcare, München) gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mittels einer Standardgeraden mit definierten BSA-Standardlösungen.

3.12. Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS)

Mit der Dynamischen Lichtstreuungsmessung (DLS) lassen sich Größenverteilungen von Partikeln (z.B. Monomere, Aggregate) in flüssigen Proben (Suspensionen) analysieren. So können Partikel im Größenbereich von Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern unterschieden werden. Dies geschieht durch Bestrahlung der Probe mit Laserlicht (633 nm) und Messung der Intensität der gestreuten Strahlung. Die Brownsche Molekularbewegung der Partikel führt zu kleinen Fluktuationen in der Streuintensität, dessen zeitlicher Verlauf Informationen über die Geschwindigkeit der Partikel liefert. Daraus lassen sich der Diffusionskoeffizient und der hydrodynamische Durchmesser der Teilchen ableiten. Für die Messungen an den PEGylierten Nanopartikeln wurde der Malvern Zen1690 (Malvern Instruments, Herrenberg) verwendet.

3.13. Tierversuche

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg durchgeführt (Tierversuchsnummer 1/14).

In dem hier durchgeführten Pilotversuch wurden die drei Mäuse einzeln mit einer Isofluran-Anlage (Dräger) betäubt. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet

und ein Deckgläschen über diesen geklebt. Unter dem Mikroskop (Nikon A1 Confocal Mikroskop) wurde die Leberoberfläche, sowie das Innere der Leber über einen Zeitraum von 1-1.5 h betrachtet. Die Injektionen der Versuchslösungen (PEGylierte Qdots), die Betäubungen, die Intravitalmikroskopie, die Organperfusionen und Tötungen der Tiere wurde von Dr. M. Heine durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden nach angegebener Zeit durch eine Überdosis Ketamin/Rompun getötet.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene ölsäurestabilisierte, monodisperse Eisenoxidnanopartikel-Kerne mit einem Polymer verpackt, dessen Polymerteil durch Reaktion mit verschiedenen Aminverbindungen modifiziert werden sollte. Dadurch wurde eine Plattform an Partikeln mit unterschiedlichen Eigenschaften erhalten, die anschließend *in vitro* untersucht wurden.

4.1. Polymerverpackung von SPIOs

4.1.1 Standardprozedur mit Ultraschall

Es standen neben dem Standardmaterial (11 nm Eisenoxidkern, Charge Sunhild Salmen) drei monodisperse, ölsäurestabilisierte SPIOs in Chloroform-Lösung zur Verfügung (4, 10, 18 nm Kerne), bei denen die Verpackung mit dem Polymaleinsäure-1-Octadecen-Polymer (PMAOD) angewendet werden sollte.

Dieses kommerziell erhältliche, gut charakterisierte Polymer (Abb. 1) wurde bereits in der Literatur von verschiedenen Autoren verwendet und ist auch in der Arbeitsgruppe gut bekannt [Shtykova et al. 2008, Freund et al. 2012]

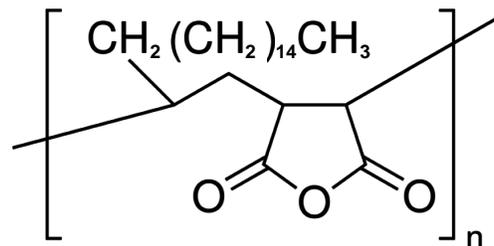


Abbildung 4.1: Formel von Poly(Maleinsäureanhydrid-alt-1-octadecen). Die Anhydridbindung wird im wässrigen Milieu rasch hydrolysiert und es entstehen bei neutralem pH Säuregruppen mit jeweils einer negativen Ladung.

Dieses Polymer hat einen lipophilen Oktadecenteil, der mit der Ölsäure auf der Partikeloberfläche interagieren kann, während die negative Ladung der Carbonsäure, die bei der Reaktion des Anhydrids mit Wasser entsteht, die Partikel durch Abstoßung vor Agglomeration schützt und wasserlöslich macht. Dieses Polymer kann auch für QDs verwendet werden, die ebenfalls Ölsäure auf der Oberfläche tragen.

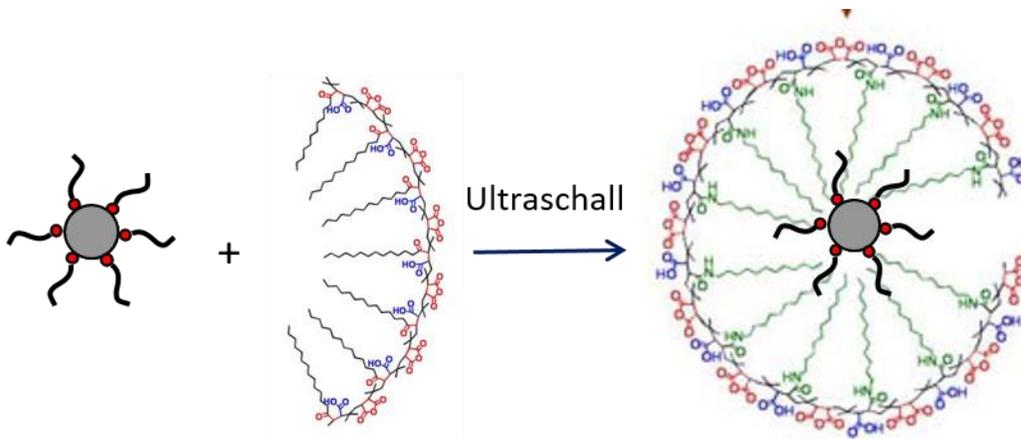


Abbildung 4.2: Prinzip der Verpackung eines ölsäurestabilisierten Eisenoxidkernes mit dem PMAOD-Polymer unter Ultraschalleinfluß. Das Polymaleinsäureanhydrid reagiert mit Wasser und umschließt den lipophilen Kern. Freie Carboxylgruppen sind nach außen gerichtet und bewirken die Wasserlöslichkeit.

Es wurden die verschiedenen Eisenoxidkerne analog der im Labor üblichen Methode (Freund et al. 2012) mit PMAOD in Chloroform gerührt und mit Ultraschall solubilisiert. Nach entsprechender Aufarbeitung wurden bei der Zentrifugation Pellets erhalten, die nach Lösen in Puffer unterschiedlich gefärbte Lösungen von den polymerverpackten SPIOs erbrachten (Abb. 4.3).

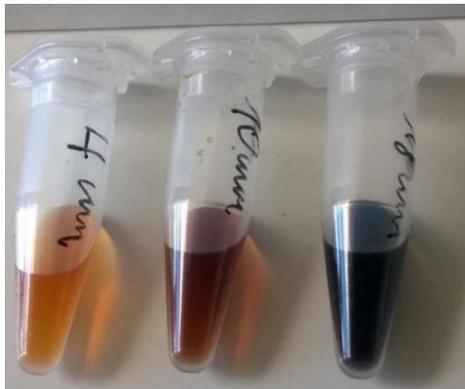


Abbildung 4.3: Wässrige Lösung von polymerverpackte SPIOs. Die verschiedenen Partikel (4, 10, 18 nm Kerne) sind an unterschiedlichen Färbungen von orange bis tiefschwarz bereits optisch gut zu unterscheiden.

Im Vergleich zur Verpackung der 11 nm Standardpartikel war auffällig, dass bei den 18 nm Partikeln in der ersten Zentrifugation bei 5000 RPM deutlich mehr agglomerierte Partikel entfernt werden mussten. Bei den 4 nm-Partikeln war in der

abschließenden Ultrazentrifugation (50000 RPM) die Pellettbildung nur unvollständig und es ging ein Teil der Partikel im Überstand verloren.

Die **FPLC-Analyse** zeigte die 11 nm-Standard-SPIOs im gewohnten Chromatogramm mit einem Vorpeak bei kleinerem Elutionsvolumen (17.4 min) und dem Hauptpeak bei 26 min (Abb. 4.4).

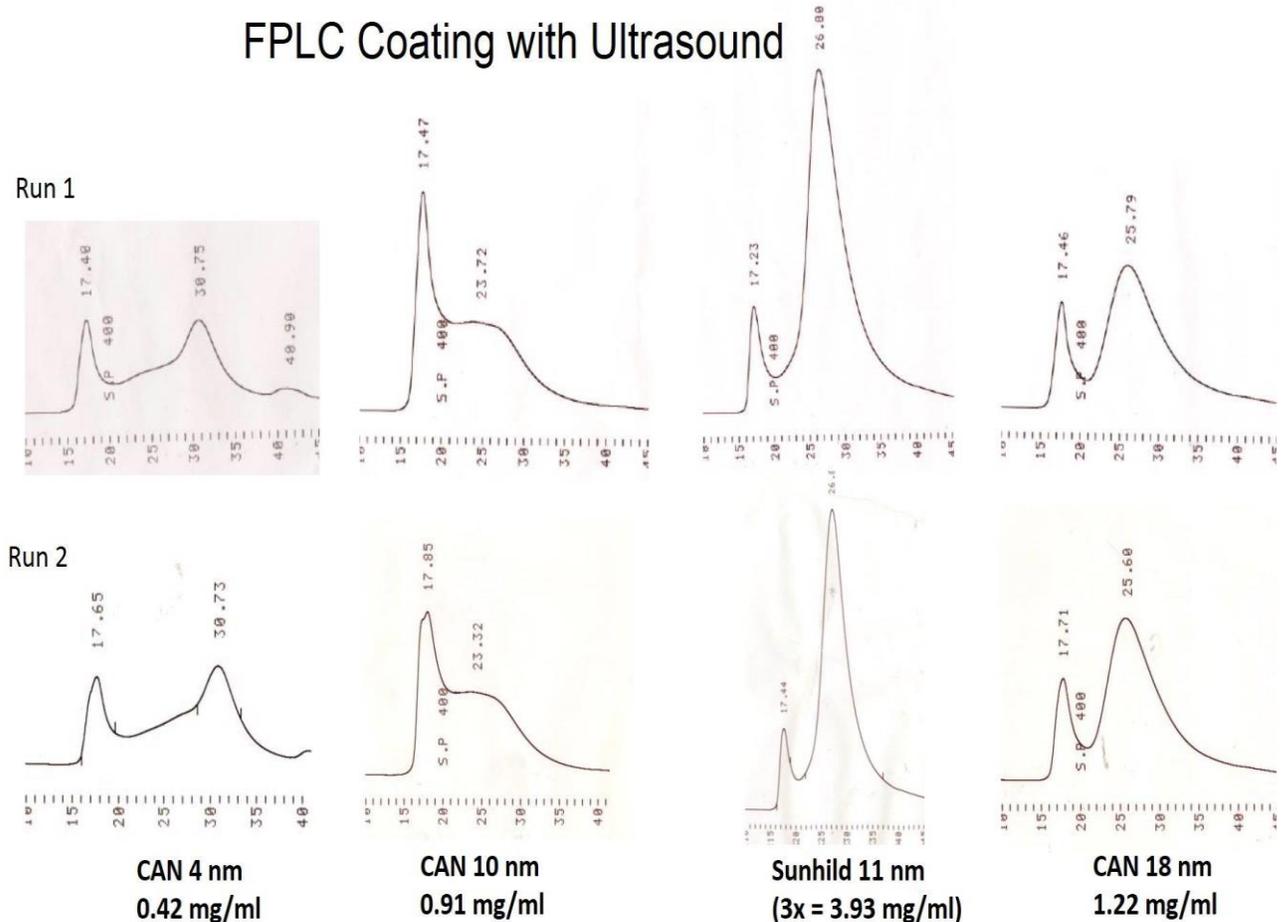


Abbildung 4.4.: FPLC von den polymerverpackten, wasserlöslichen SPIOs mit unterschiedlicher Kerngröße (4-18 nm). Angegeben sind auch die Konzentrationen aus der Eisenbestimmung, die bei gleichem Volumen etwas zur relativen Ausbeute aussagen.

Der Peak bei 17.4 min repräsentierte das Ausschlußvolumen der Säule. Hier würden also alle größeren Partikel erscheinen, wie Di- oder Trimere. Eine weitere Auftrennung ist hier also nicht gegeben, während die Peaks zwischen 20-30 min mit

der Partikelgröße korrelieren sollten. Niedermolekulare Substanzen würden bei > 40 min erscheinen. Detektiert wurde bei 280 nm, sodass wohl nur eisenhaltige SPIOs erkannt werden, nicht aber Polymerreste (Carbonsäureanhydride, bzw. Carbonsäuren).

Die 4 nm-Partikel trennen sich auf der Säule deutlich in zwei unterschiedliche Fraktionen auf, eines mit deutlich kleinerer Molekülgröße (30.7 min). Hierbei könnte es sich um verpackte mono- und dimere/trimere? Kerne handeln. Gleiches gilt auch für die 18 nm-Kerne, wobei die vermeintlich monomere Form eine vergleichbar große Molekülgröße aufweist wie die 11 nm Partikel (25.6 vs. 26.0 min). Dies zeigt, dass die Größe der verpackten SPIOs nicht proportional zur Kerngröße ansteigen muss. Auch die 10 nm Kerne sind deutlich anders. Hier liegt auch ein großer Anteil von größeren Partikeln vor. Die Reproduzierbarkeit der FPLC ist sehr gut. Hier wurde eine direkte Folge von 4 Chromatogrammen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen aufgenommen (run 1 und run 2). Diese Methode ist daher optimal geeignet, um solche Verpackungseffekte grob zu quantifizieren.

Um eine ergänzende Aussage über die Partikelgröße zu erhalten, wurde eine DLS-Analyse (Malvern Zetasizer V. 6.01) durchgeführt (Abb. 4.5). Es ergeben sich sogenannte PDIs (Polydispersity-Index) > 0.1 aber < 0.4, was für Mischungen von monodispersen Partikeln spricht. Die 4 nm und 18 nm haben Werte von 0.32, die 10 und 11 nm Partikel sind mit 0.23 monodisperser. Hierbei können schon kleine Anteile hochmolekularer Spezies die Werte hochdrücken, weil diese mehr gewichtet werden. Auffällig ist bereits die sichtbare Bi-dispersität für die 4 nm Partikel. Das passt zu der FPLC-Analyse. Dann fällt weiter auf, dass die 10 nm-Partikel deutlich größer sind als die 11 nm Partikel!

DLS of SPIOs coating with ultrasound

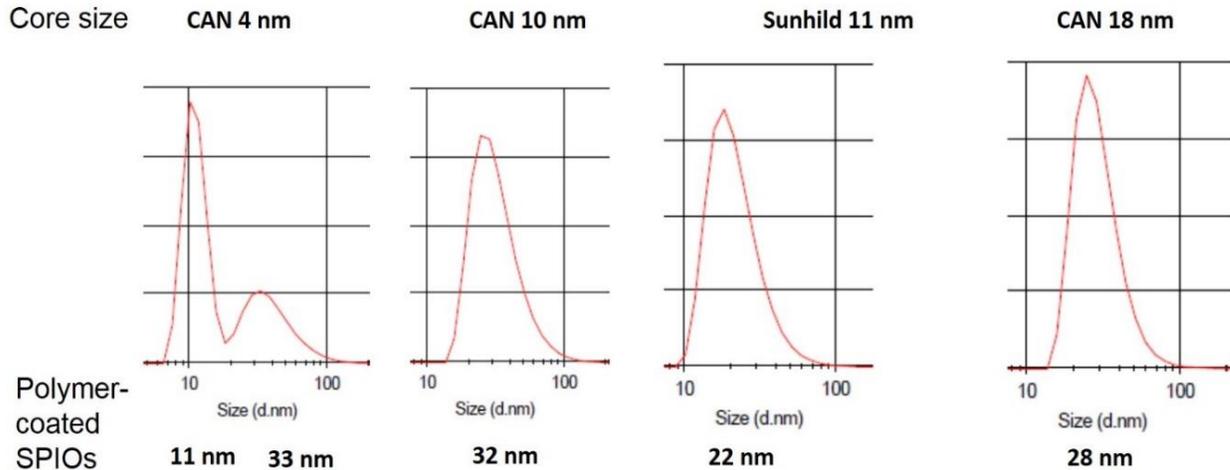


Abbildung 4.5. DLS von mit Ultraschall-verpackten SPIOs (4, 10, 11, 18 nm)

4.1.2. Verpackung von SPIOs ohne Ultraschall

In einem weiteren Versuch wurde das Weglassen der Ultraschallbehandlung ausprobiert. Es bestand die Frage, ob auch ohne die intensive Ultraschallbehandlung grundsätzlich eine definierte Umhüllung der lipophilen Kerne mit dem Polymer möglich ist.

Dazu wurde jeweils der übliche Ansatz Partikel und Polymer in Chloroform bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Danach Abdampfen bis zur Trockne und erneute Aufnahme in 100 µl Chloroform. Dann Zugabe von 20 % TBE-Puffer und intensives Rühren über 3 Tage. In diesem Verlauf gingen sichtbar SPIOs-Anteile in die wässrige Phase über. Danach Rühren bei offenen Gefäßen für 24 h, um das Chloroform vollständig zu entfernen. Danach Erhitzen und Schütteln bei 60 °C und Zentrifugation bei 5000 RPM zur Entfernung von Agglomeraten (Abb. 4.6).



Abbildung 4.6.: Herstellung von wasserlöslichen SPIOs aus den 4, 10, 11 (Referenz, Charge SC 237), 18 nm-Kernen ohne Ultraschall. Links, Abtrennung von Agglomeraten durch Zentrifugation bei 5000 RPM (Röhrchen oben). Rechts, leicht trübe Lösungen nach Ultrazentrifugation und Auflösung der Pellets.

Dabei waren deutliche Agglomerate zu erkennen, die abzutrennen waren. Dies verminderte die Ausbeute im Vergleich zur Ultraschallmethode deutlich. Anschließend übliche Ultrazentrifugation bei 50000 rpm (Abb. 4.6, links). Die Lösungen der SPIOs waren leicht trübe, was wohl als Reste von hochmolekularen Polymer+Ölsäure zu deuten sind.

Die FPLC (Abb. 4.7) zeigte für die 11 nm Partikel ein sehr ähnliches Bild bei dem Versuch mit Ultraschall. Hier führt offenbar die Inkubation allein zu einer gleichen Umhüllung des Eisenoxidkernes wie mit Ultraschall. Dies spricht insgesamt für eine thermodynamisch stabile Einstellung eines festen Gleichgewichtes mit einer Hauptform (> 90%) bei ca. 25 nm und einer geringen Beimengung eines größeren Partikels.

Auch die 4 nm Partikel zeigen ein ähnliches Muster wie bei dem Versuch mit Ultraschall (vergl. Abb. 4.2). Auch dies spricht für eine vorwiegend thermodynamisch

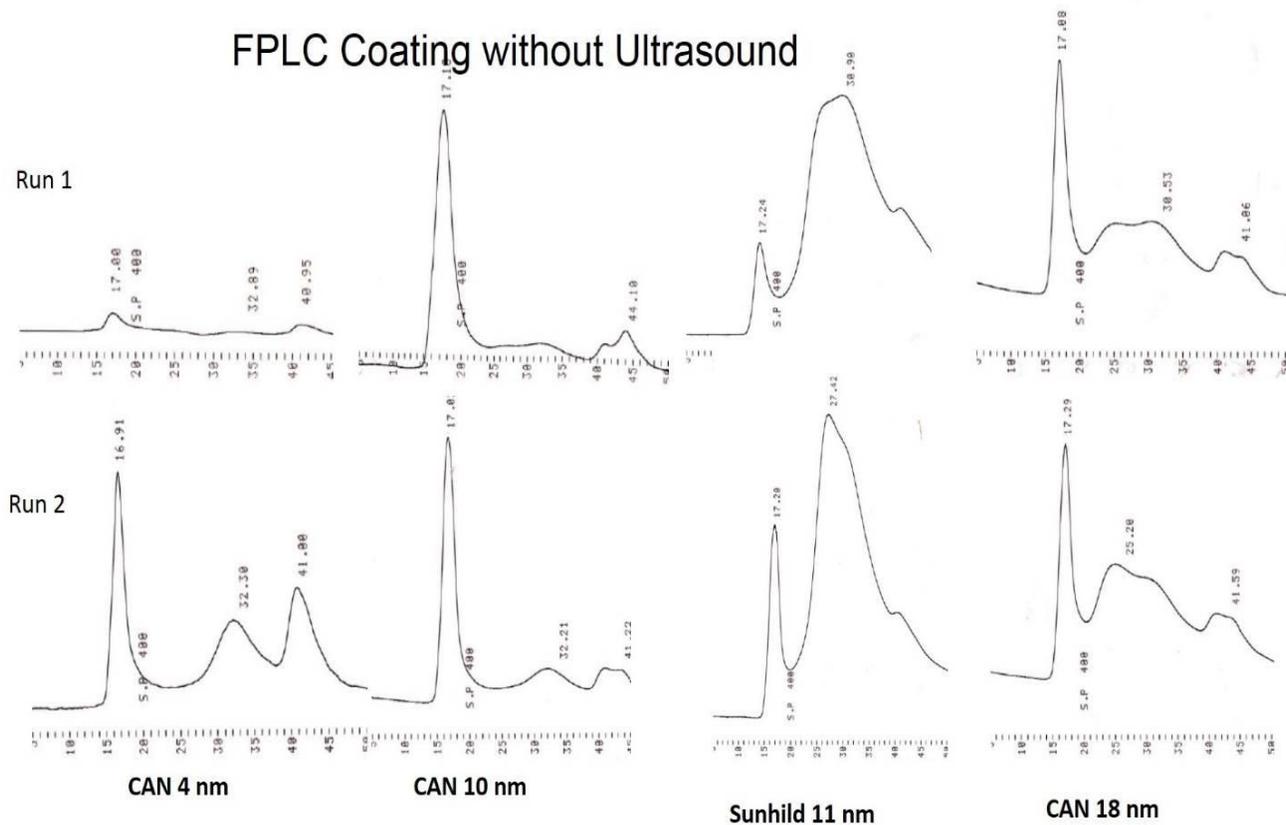


Abbildung 4.7.: FPLC-Läufe an zwei Tagen von polymer-verpackten SPIOs (4, 10, 11, 18 nm core), Versuch ohne Ultraschall.

bedingte Gleichgewichtseinstellung. Bei den 10 und den 18 nm Kernen sind die Relationen deutlich hin zu der größeren Partikelform verschoben. Hier könnte die Ultraschallung einen kinetischen Effekt zur Bildung einer monomeren(?) Form mit 20-30 nm Größe bewirken.

Diese Interpretation wird durch die DLS-Daten bestätigt (Abb. 4.8, s. auch Anhang).

Als zusammenfassendes Ergebnis zeigte sich, dass die FPLC eine reproduzierbare analytische Methode für polymerverpackte SPIOs ist. Die verwendete 11 nm Partikelcharge scheint eine Art „Insel der Stabilität“ zu sein, die sich mit verschiedenen

Methoden reproduzierbar verpacken lässt. Die ähnlich großen 10 nm Kerne verhalten sich ganz anders, was evtl. weniger auf die Kerngröße sondern mehr auf eine Chargenabhängigkeit hindeuten könnte.

DLS of SPIOs coating without ultrasound

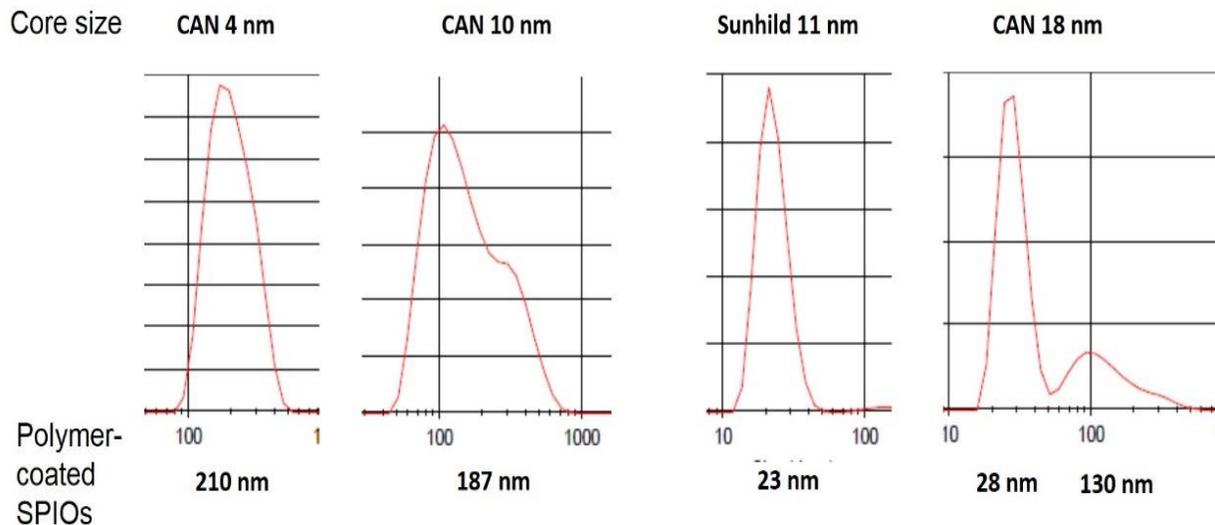


Abbildung 4.8: DLS von ohne Ultraschall-verpackten SPIOs (4, 10, 11, 18 nm)

4.2. Modifizierung der Polymerhülle von SPIOs

Es sollten verschiedene Modifikationen der in der Abteilung verwendeten Polymerhülle (Polymaleinsäure-1-Octadecen, PMAcOD) von SPIOs und Quantum Dots (Qdots) vorgenommen werden (Abb. 4.9).

4.2.1. Reaktion mit Fluoreszeinamin und Polyethylenimin (PEI)

Fluoreszein ist ein bekannter fluoreszierender Farbstoff. Es gibt davon ein Aminderivat, das sich für die Kopplung an die Säuregruppe des PMOCd-Polymer eignet. Es ist bekannt, dass Eisenoxidkerne von Nanopartikeln effektive Fluoreszenzlö-

scher (=Quencher) sind, wenn sie in unmittelbare räumliche Nähe zur fluoreszierenden Gruppe kommen. Es stellte sich also die Frage, ob der Abstand des am Polymer gebundenen Fluoreszeinmoleküls zur Metalloberfläche des Kerns groß genug ist, um einen solchen Effekt zu verhindern.

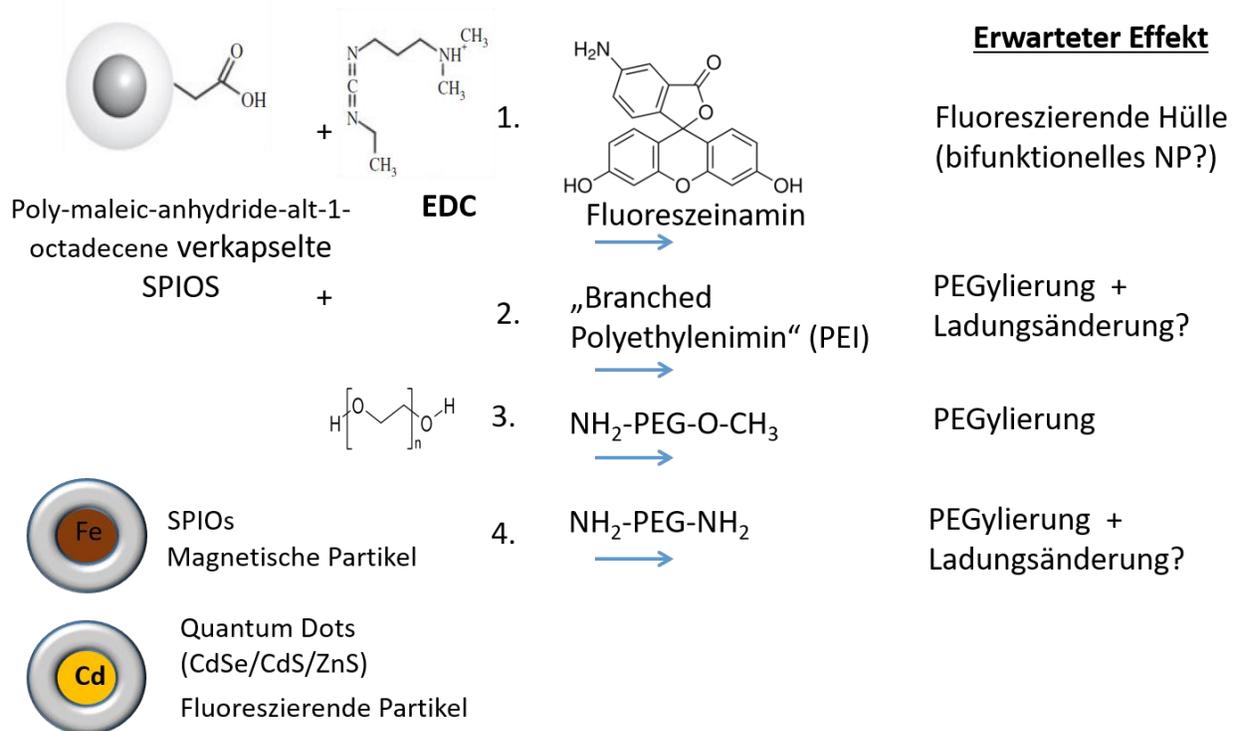


Abbildung 4.9: Modifizierung der Polymerhülle durch Reaktion von verschiedenen Aminen mit der Carboxylgruppe des PMAcOD-Polymers. EDC, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid; PEG, Polyethylenglykol

Der entsprechende Kopplungsansatz für die Reaktion von polymerverpackten SPIOs und dem Fluoreszeinamin wurde über Nacht bei RT mit EDC als Kopplungsreagenz inkubiert. Eine FPLC zeigte zwei überlappende Peaks und es wurden drei Fraktionen daraus aufgefangen (Abb. 4.10). Bereits per Augenschein zeigten die Fraktionen 1 und (abgeschwächt) Fraktion 2 eine gelbe Farbe, die unter UV-Belichtung eine gelb fluoreszierte.

In der Elektrophorese wanderte die aufgetragene Fraktion 1 kaum. Im Detail co-migrierte dabei eine gelbfluoreszierende Bande, die visuell braun erschien wie die typische Eisenoxidbande von SPIOs. Damit wurde bei dieser Reaktion wohl eindeutig ein bifunktionelles SPIOs mit sowohl magnetischen als auch fluoreszenz-optischen Eigenschaften hergestellt.

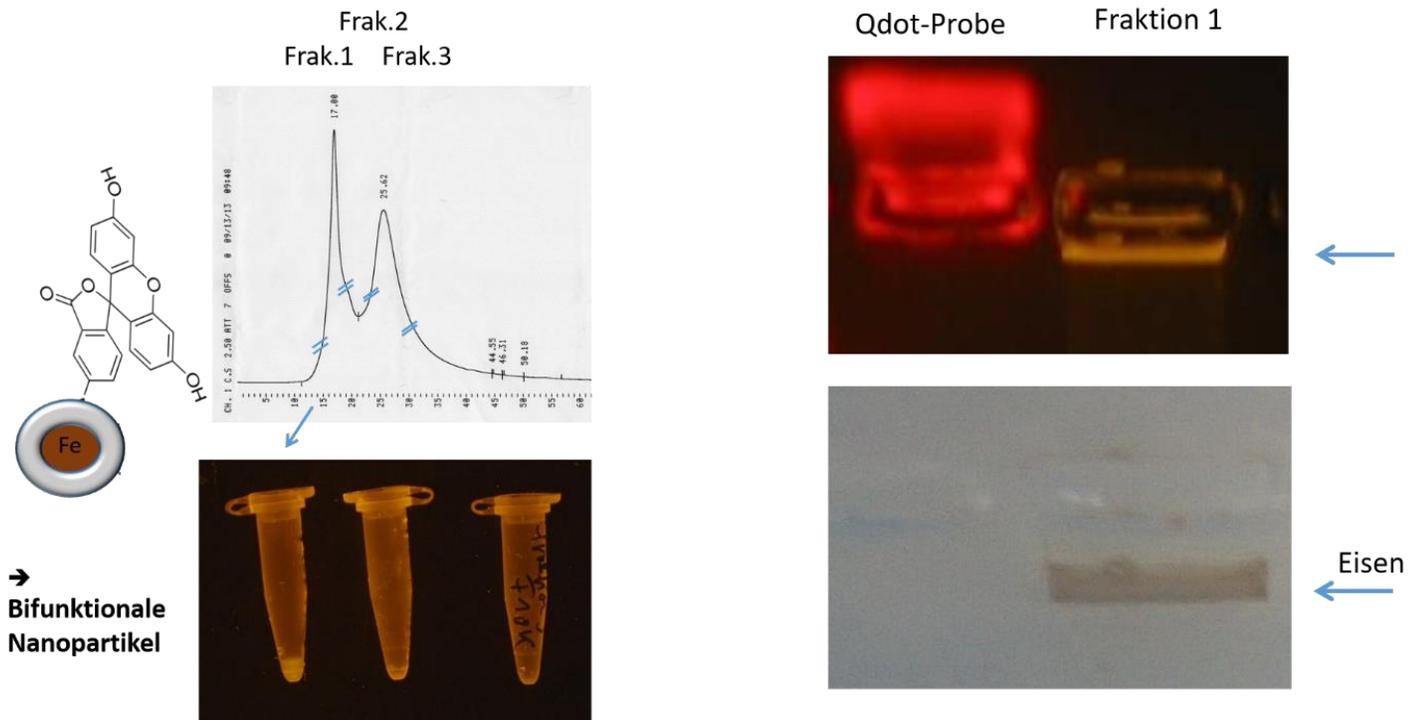


Abbildung 4.10: Charakterisierung eines fluoreszierenden SPIOs. von EDC-gekoppelten Fluoreszeinamin an polymerverpackte SPIOs. Links FPLC Chromatographie des Ansatzes mit 3 aufgefangenen Fraktionen. Die hochmolekulare Fraktion 1 fluoresziert im UV-Licht. In der Elektrophorese (linker Bildteil) ist im UV-Licht eine fluoreszierende Bande sichtbar, die im Normallicht braun gefärbt ist (Farbe von Eisenoxid). Zum Vergleich eine Probe von N-PEGylierten Quantum Dots (Elektrophorese, linke Bande)

Polyethylenimin (PEI) ist das Polymerisierungsprodukt seines Monomers Ethylenimin. Eine verzweigte Version („branched PEI“) ist erhältlich, die primäre, sekundäre und tertiäre Amine enthält und Metallionen chelieren kann (Abb. 4.11).

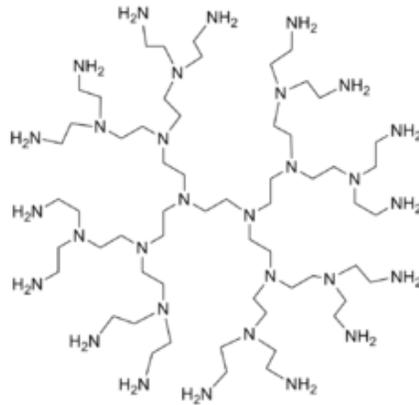


Abbildung 4.11. Branched Polyethylenimin (PEI) Abbildung von en.wikipedia.org

„Branched PEI“ kann auch DNA binden und ist in Form von verpackten Nanopartikeln bereits für Transfektionsexperimente eingesetzt worden (Wightman et al. 2001). Es sollte hier versucht werden, PEI an das PMAOcD-Polymer zu binden.

Ein entsprechender Reaktionsansatz erbrachte aber nur ein zähflüssiges Pellet, das in Wasser nicht in Lösung zu bringen war. Möglicherweise führt dies zu einer Quervernetzung von vielen SPIO-Kernen in einer Reaktion, die schwer zu steuern sind. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiterverfolgt.

4.2.2 PEGylierung mit Methoxy-PEG

Der erste Schritt zur PEGylierung ist die Funktionalisierung des Polyethylenglykol-Moleküls an den beiden Enden. Polyethylenglykole, die an beiden Molekülenden mit der gleichen funktionellen Gruppe aktiviert sind, heißen „homobifunktional“, mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen „heterobifunktional“.

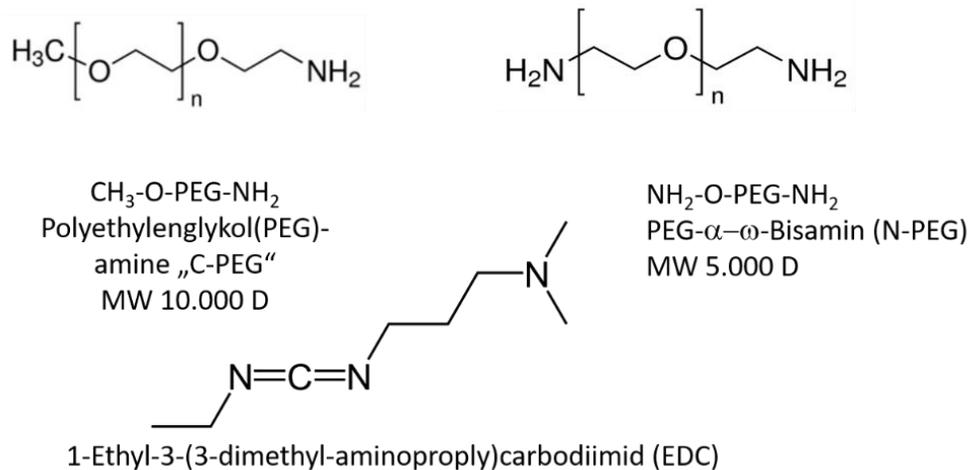


Abbildung 4.12: Strukturformeln der verwendeten PEGs (von C-PEG, N-PEG) und EDC.

In dieser Arbeit sollten polymerverpackte SPIOs und Quantum Dots möglichst gezielt PEGyliert werden. Dazu wurde mit dem heterobifunktionellen $\text{CH}_3\text{-O-PEG-NH}_2$ (C-PEG) begonnen (Abb.4.12), das mit einer relativ inerten Methoxy-Gruppe ein monofunktionelles PEG darstellt. Die freie Aminogruppe kann mit der Säuregruppe des Polymers zu einem Säureamid reagieren.

Dazu wurde sich an eine Vorschrift aus der Literatur gehalten, bei der unterschiedliche Konzentrationen an 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid (EDC) als Kupplungsreagenz eingesetzt wurden (Pellegrino et. al. 2014). EDC wirkt über einen weiten pH-Bereich (pH 4-9) und wird häufig zur Synthese von Carbonsäureamiden und zur chemischen Vernetzung (Cross-Linking) von Proteinen verwendet.

Bezogen auf die gemessene Eisenkonzentration der vorliegenden Partikellösung wurde EDC im Überschuss (200-10.000fach) eingesetzt (Abb. 4.13). Es zeigte sich in jedem Ansatz im Wesentlichen nur ein Peak, der mit steigender EDC-Konzentration zu kürzeren Elutionszeiten verschoben wurde. Durch den zunehmenden Grad der PEGylierung werden die Partikel deutlich größer. Dies bestätigt sich auch in der DLS. In der Elektrophorese (Abb. 4.13, Mitte) laufen die PEGylierten Formen langsamer bzw. bleiben in der Elektrophorese stehen

(10.000fach EDC).

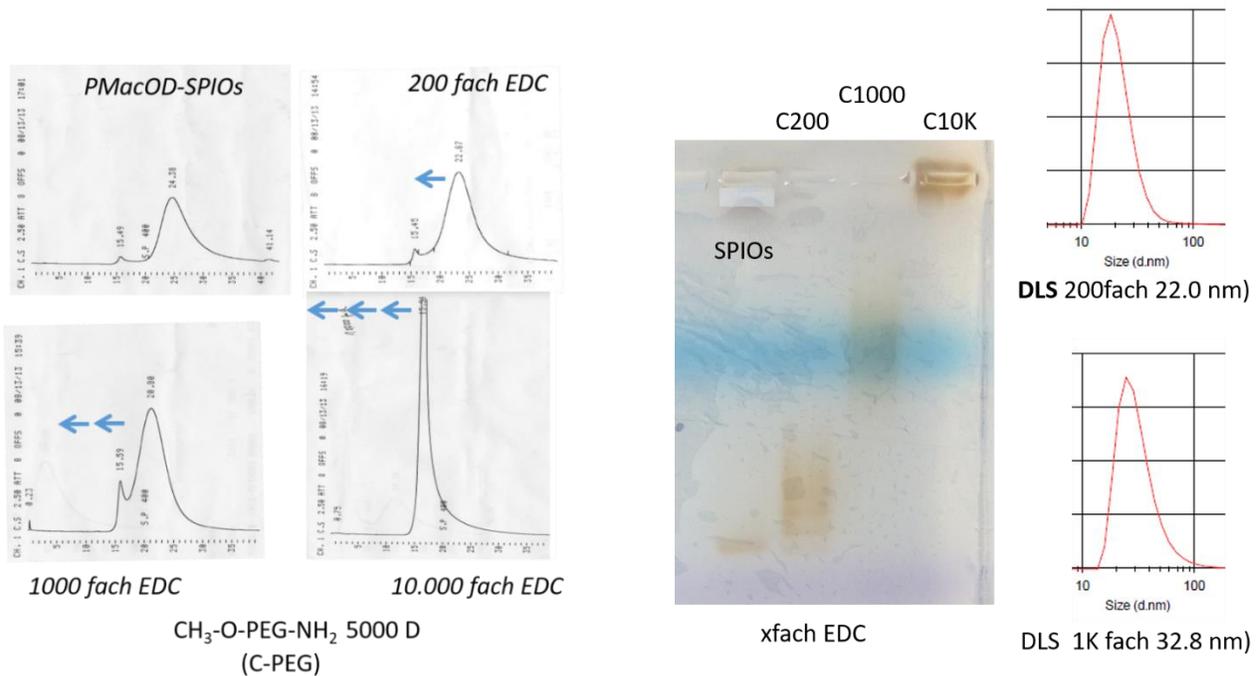


Abbildung 4.13. FPLC, DLS und Elektrophorese von Ansätzen mit $\text{CH}_3\text{-O-PEG-NH}_2$ (MW10.000) mit EDC als Kopplungsreagenz in verschiedener Konzentration (C200=200fach Überschuss an EDC).

Dazu könnten zwei Effekte beitragen: a) die Abnahme der Ladung auf der Oberfläche durch die Säureamidbindung durch PEG und b) die Zunahme der Partikelgröße durch die PEGylierung, was beides die Laufgeschwindigkeit im Gel verringert.

Die PEGylierungsversuche mit unterschiedlichen EDC Konzentrationen wurden anschließend auch mit Qdots (grüne Kern-Schale-Schale-Partikel; CdSe/CdS/ZnS) durchgeführt. In der Elektrophorese sind die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der unterschiedlich stark PEGylierten SPIOs und Qdots sehr gut vergleichbar (Abb. 4.14). Das Kernmaterial spielt für die PEGylierung der äußeren Schale offensichtlich keine Rolle.

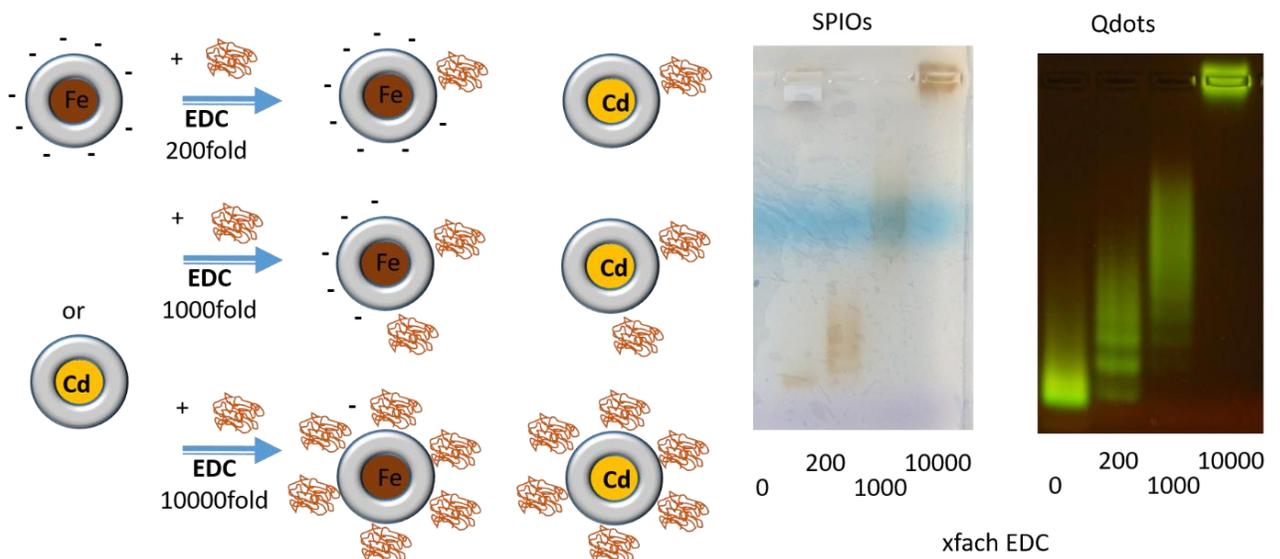


Abbildung 4.14. Stufenweise PEGylierung von SPIOs und Qdots mit $\text{CH}_3\text{-O-PEG-NH}_2$ (MW10.000). In der Gelelektrophorese laufen die unterschiedlich PEGylierten Partikel erstaunlich ähnlich, weil das Kernmaterial offenbar keinen erkennbaren Einfluss auf die PEGylierung hat.

4.2.3. Pegylierung mit Amino-PEG

Das $\text{CH}_3\text{-O-PEG-NH}_2$ trägt nach Reaktion mit der Polymerhülle keine Ladung mehr an der Oberfläche. Bei einem echten bifunktionellen $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ sollte dies anders sein, da die freie Aminogruppe nach außen eine positive Ladung trägt. Bei einer PEGylierung von den mit dem PMAcOD-Polymer verpackten Nanopartikeln sollte sich also die Ladung von $-$ nach $+$ umkehren, was das Verhalten solcher Partikel in *in vitro* und *in vivo* Versuchen wesentlich verändern könnte.

Analog den Experimenten mit $\text{CH}_3\text{-O-PEG-NH}_2$ wurden in entsprechenden Ansätzen mit $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ (MW 5000) drei unterschiedliche EDC-Konzentrationen verwendet (200-, 1000-, 10000-facher Überschuss an EDC) (Abb. 4.15).

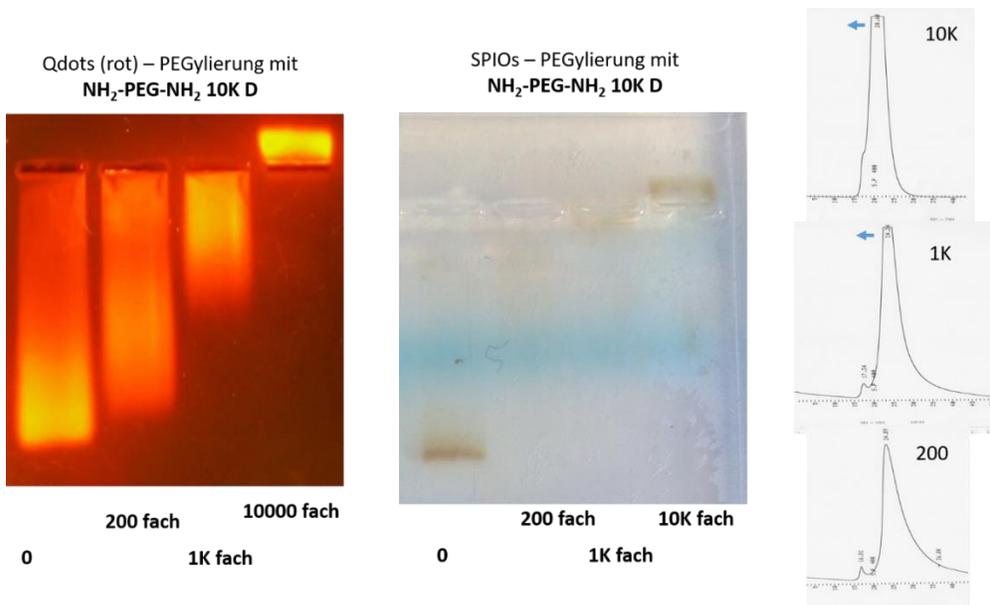


Abbildung 4.15. FPLC und Elektrophorese von Ansätzen mit $\text{NH}_2\text{-O-PEG-NH}_2$ (MW5.000) mit EDC als Kopplungsreagenz in verschiedener Konzentration.

Die verwendete Gelchromatographiesäule wurde mit humanem Serum kalibriert, indem Fraktionen aufgefangen wurden, die mit DLS anschließend vermessen wurden (Abb. 4.16). Im Vergleich zu dem Ausgangs PMAcOD-Peak bei ca. 28 min Elutionszeit und ca. 25 nm Volumen, sind die N-PEG-Teilchen größer als die C-PEG Varianten.

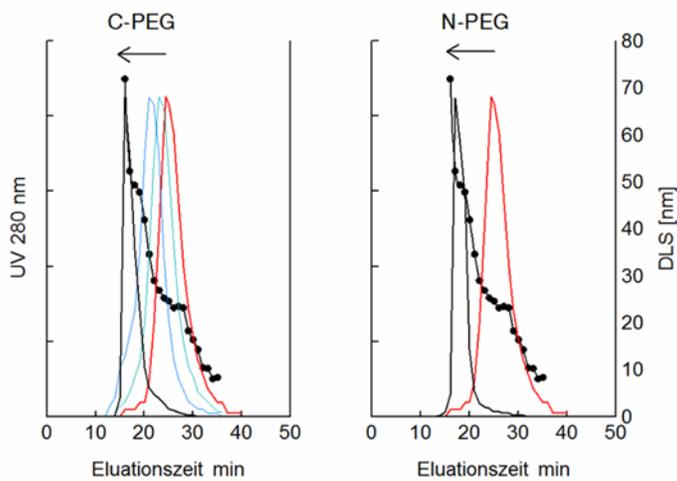


Abbildung 4.16: Kalibrierung der Größe der C- und N-PEGylierten SPIOs über Proteingrößenmessung mit DLS auf der verwendeten Gelchromatographiesäule (Superose-12)

4.3. Versuche zur Stabilität einer Proteincorona *in vitro*

Mit der gezielten PEGylierung stand eine Plattform von unterschiedlich reaktiven SPIOs zur Verfügung, an denen die Bindung von Testproteinen *in vitro* untersucht werden konnte. Dazu wurden Transferrin und Albumin als Modelproteine ausgewählt, die leicht mit ^{125}I radiomarkiert werden können, ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen (ca. 80 kDa bzw. 66 kDa) und die physiologisch relevant sind.

Im Folgenden werden zwei Versuche an verschiedenen PEGylierten SPIOs beschrieben, bei denen die Stabilität bzw. die Verdrängung von adsorbiertem bzw. kovalent gebundenem Transferrin bzw. Albumin verglichen wird.

Im ersten Versuch wurden verschiedene PEGylierte-SPIOs mit humanem ^{125}I -Transferrin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (**A**, ohne EDC; **B** mit EDC = kovalente Bindung (Abb.4.17, 4.18).

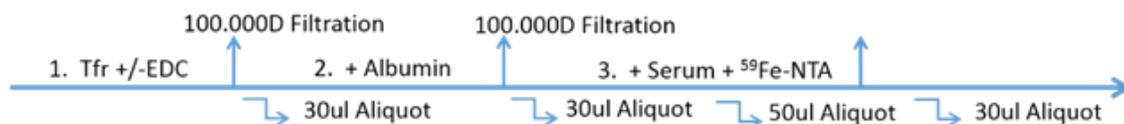


Abb. 4.1.7. Schematische Versuchsaufbau. Stufenweise Inkubation mit Transferrin, Albumin und Serum, gefolgt von 100.000D Filtrationen und Aliquotentnahmen zur Quantifizierung ^{125}I bzw. ^{59}Fe -Aktivität.

Das überschüssige freie Protein wurde mit einem 100.000 D Filtrationssystem abgetrennt und die Radioaktivität in einem Aliquot gemessen (Tabelle 5.1). Die Menge an verbleibender ^{125}I Aktivität nahm deutlich mit dem Grad der PEGylierung ab, weil offenbar weniger ^{125}I -Transferrin an die SPIOs gebunden wurde. Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen primär adsorbiertem oder kovalent gebundenem Transferrin. Zu dem Ansatz wurde nun ein 3-facher Überschuss an bovinem Albumin zugegeben, erneut 2h inkubiert und anschließend ein Aliquot über eine Superose 6-Säule chromatographiert (Abb. 4.18). Durch die PEGylierung geht die Menge an Protein, die an die Teilchen gebunden werden kann, deutlich zurück. Es ist dabei ein Unterschied, ob ^{125}I -Transferrin vorher kovalent gebunden oder nur adsorbiert war. Im ersten Fall kann es durch den Überschuss an Albumin nicht verdrängt werden (Tabelle 5.1)

	EDC	primär gebundenes ^{125}I -Tfr (%)	verbleibendes ^{125}I -Tfr nach Inkubation mit Albumin (%)	verbleibendes ^{125}I -Tfr nach Inkubation mit Serum (%)
PMAcOD-SPIOS	-	78	85	89
PMAcOD-SPIOS	+	76	100	100
C0.2K	-	51	28	29
C0.2K	+	54	31	44
C1K	-	50	21	21
C1K	+	51	92	99
C10-	-	31	10	11
C10K	+	46	51	58

Tabelle 5.1: Bindung von ^{125}I -Transferrin an verschiedene PEGylierte SPIOs. Je höher der PEGylierungsgrad ist, desto weniger Protein binden die SPIOs, egal ob adsorbiert oder kovalent gebunden. Unterschiede gibt es dann aber bei der Verdrängung durch andere Proteine.

5.1). Inkubiert man in einem 3. Schritt nach gleicher Aufarbeitung noch mit einem Überschuss an humanem Serum, dann verändert sich die Situation nicht grundsätzlich, wenn es vorher kovalent gebunden war.

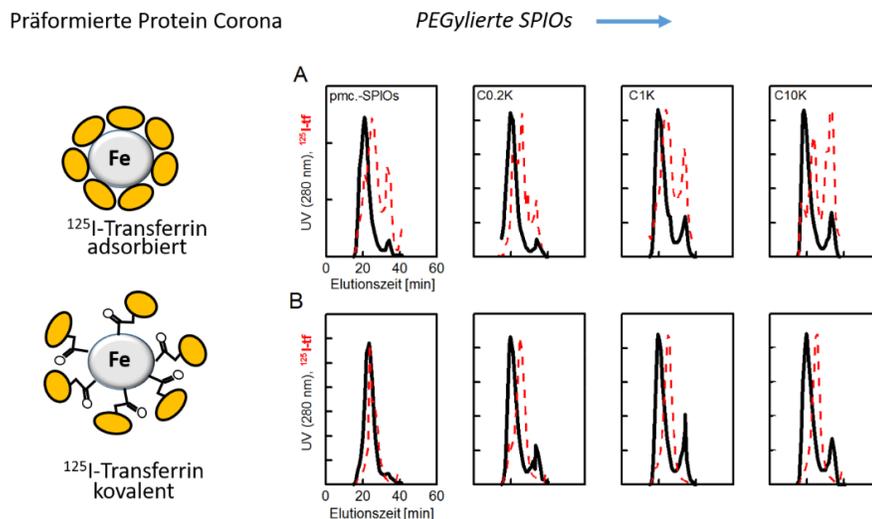


Abbildung 4.18. Stabilität der präformierten ^{125}I -Transferrin-Corona nach Austausch gegen einen Überschuss an Albumin. **A**, ^{125}I -Transferrin wurde erst an verschiedene PEGylierte SPIOs adsorbiert. Nach Entfernung von überschüssigem Transferrin wurde ein 3-facher Überschuss an bovinem Albumin gegeben und 2 h inkubiert. **B**, ^{125}I -Transferrin wurde anfangs mit EDC kovalent gebunden. Der Peak bei ca. 33 min entspricht freiem Transferrin bzw. Albumin. Die FPLCs zeigen, dass Albumin große Anteile an ^{125}I -Transferrin verdrängt, wenn dieses vorher adsorbiert war.

In einem zweiten Experiment wurde anfangs „kaltes“ Transferrin an die SPIOs als „hard“ corona gebunden, um dann mit ^{125}I -markiertem Albumin zu interagieren (Abb. 4.19 und 4.20).

Die Auswertung der ^{125}I -Aktivität in Fraktionen zeigt, dass die EDC-gekoppelte Inkubation von SPIOs mit Transferrin zu einer festen Proteincorona führt, an die sich ^{125}I -Albumin nicht mehr anlagern kann. Der Peak bei 36 min Retentionszeit entspricht freiem Albumin+Transferrin. Im Falle von primär adsorbiertem Transferrin kann dies im Austausch gegen Albumin verdrängt werden. Die anschließende Inkubation mit ^{59}Fe -NTA zeigt, dass das an den SPIO gebundene Transferrin noch physiologisch aktiv ist, d.h. ^{59}Fe -binden kann.

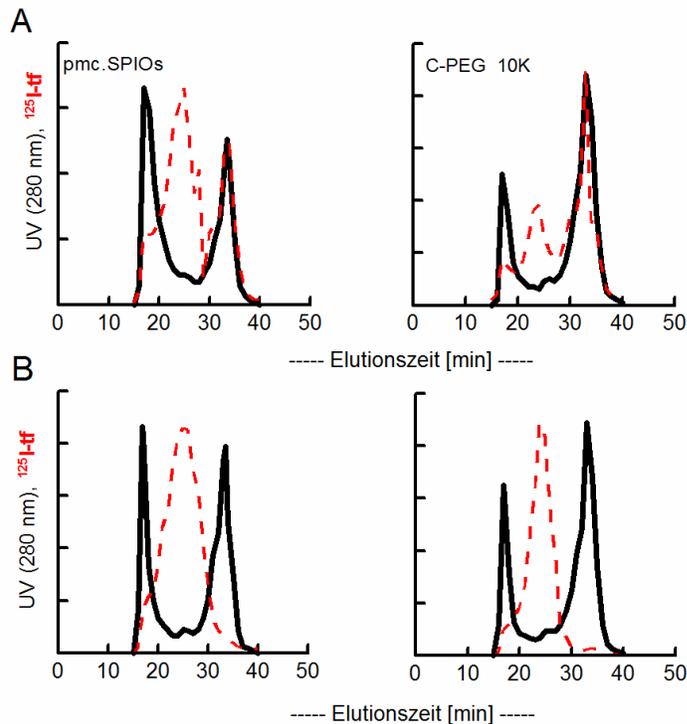


Abbildung 4.19: FPLC Analyse von dem verbliebenen ^{125}I -Transferrin nach Inkubation mit einem 3-fachen (bezogen auf die ursprüngliche Transferrinmenge) humanem Serum. Der SPIOs-Peak (ca. 25 min) wird durch die Plasmaproteine überlagert. Kovalent gebundenes Transferrin (B) bleibt stabil gebunden, adsorbiertes Transferrin wird weiter verdrängt (A).

Das erwartete Ergebnis zeigen auch Versuche mit den PEGylierten SPIOs (Abb. 4.21). Adsorbiertes Transferrin wird durch Albumin teilweise verdrängt, kovalent gebundenes nicht.

Präformierte Protein Corona

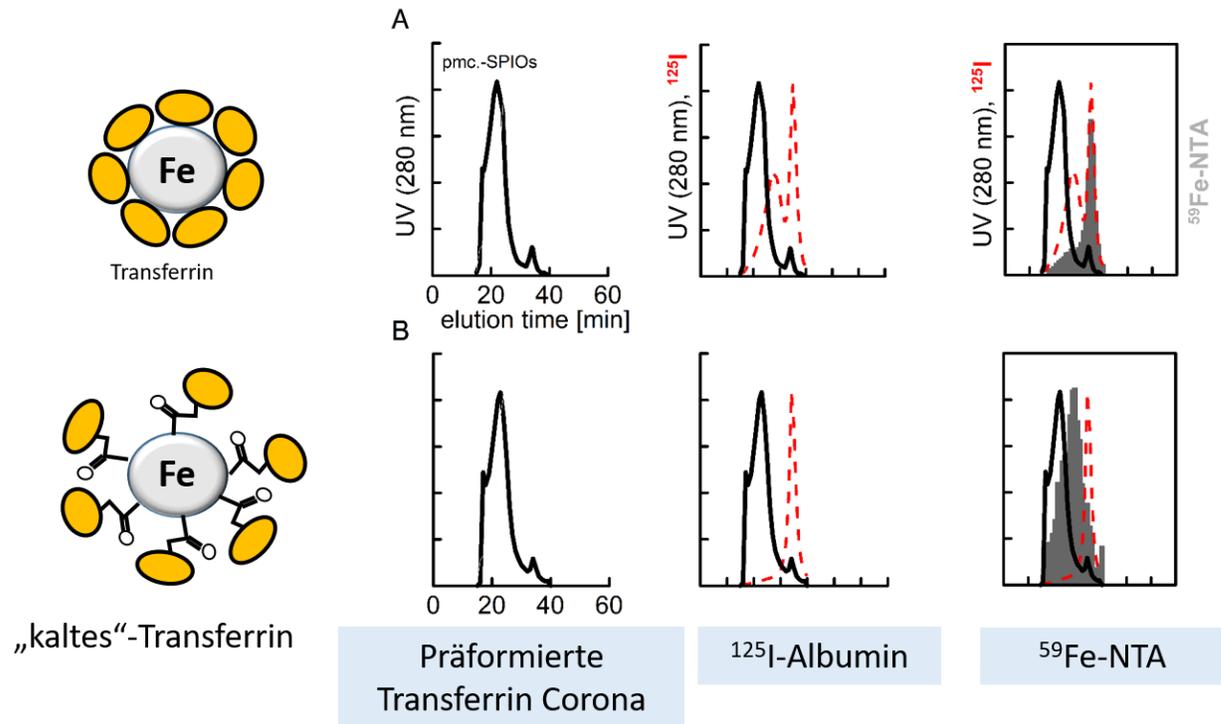


Abbildung 4.20: Stabilität und Funktionalität einer Proteincorona mit Testproteinen Transferrin und Albumin Das primär an das polymerverpackte SPIOs adsorbierte Transferrin wird partiell von sekundär zugegebenem ¹²⁵I-Albumin verdrängt, während das primär kovalent gebundene Transferrin die Bindung von Albumin verhindert. Die Zugabe von ⁵⁹Fe-NTA zeigt, dass das an das SPIOs gebundene Transferrin mindestens teilweise noch funktionell ist und ⁵⁹Fe binden kann (dunkel schraffierte Fläche = ⁵⁹Fe-Aktivität).

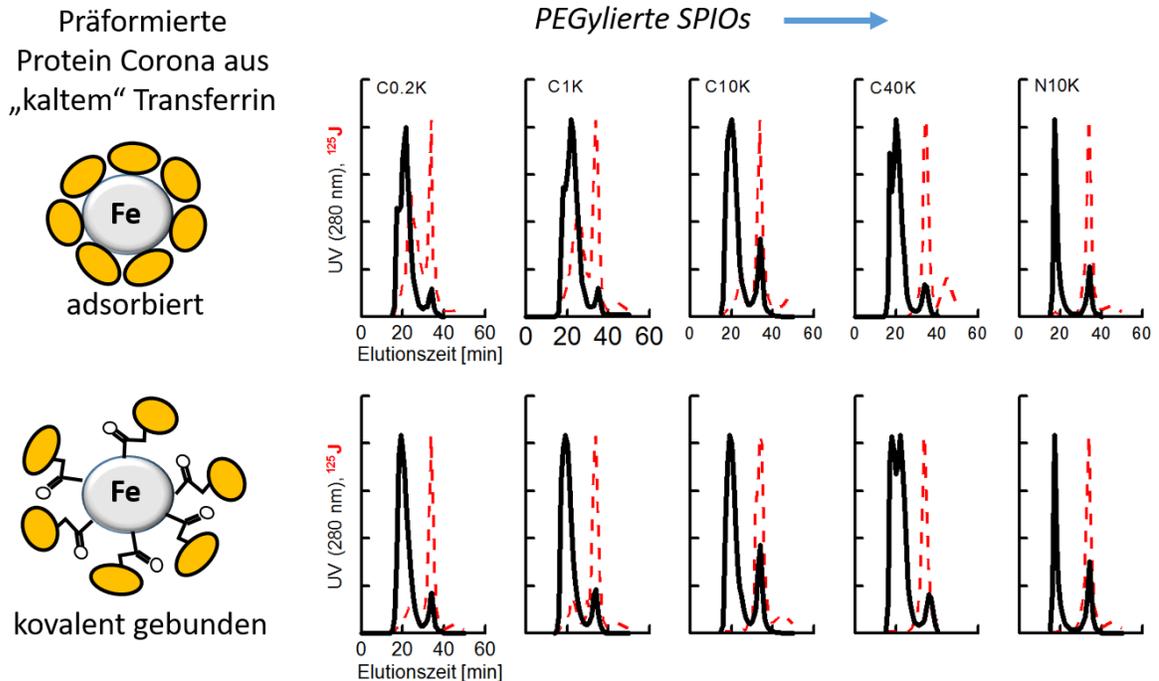
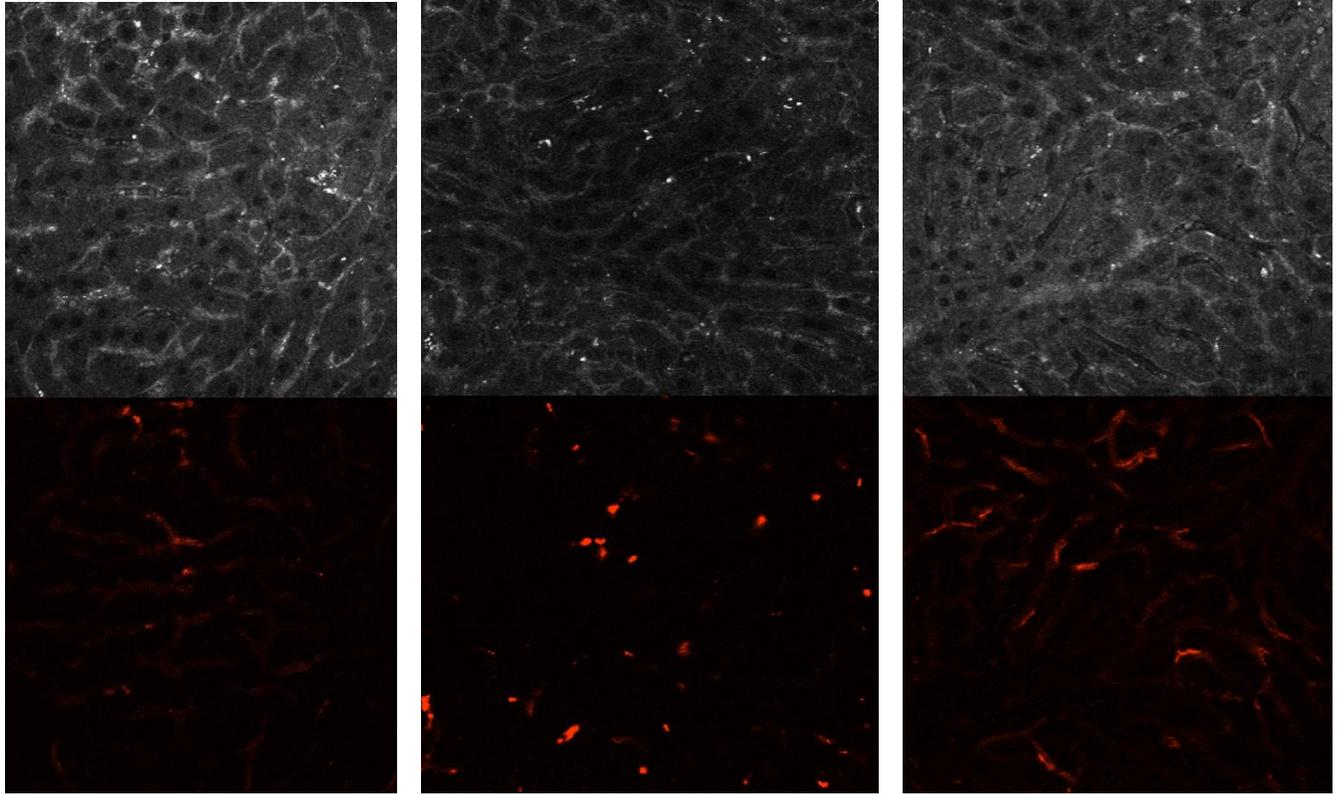


Abbildung 4.21: Stabilität einer Proteincorona an partiell PEGylierten SPIOs. Das primär an PEGylierte SPIOs adsorbierte Transferrin wird partiell von sekundär zugegebenem ^{125}I -Albumin verdrängt, während das primär kovalent gebundene Transferrin die Bindung von Albumin verhindert. Die pegylierten Varianten C40 und N10 binden überhaupt kein Protein mehr.

4.4. Intravenöse Injektion von PEGylierten SPIOs in Mäusen

Für einen *in-vivo* Tierversuch wurden rote Quantum Dots mit dem PMAcOD-Polymer verpackt und auf analoger Weise mit C10 und N10-PEG-Varianten PEGyliert. Mit einer 10.000 Dalton Filtereinheit wurden kleinmolekulare Verunreinigungen entfernt.

In einer Pilotstudie wurden die fluoreszierenden Lösungen in geeigneter Konzentration in jeweils einem Versuchstier intravenös injiziert, um die Verteilung mit einem Fenster über der Leber mittels Intravitalmikroskopie verfolgen zu können (Abb. 4.22). Im Vergleich zu dem nicht-PEGyliertem PMAcOD-SPIOs wurde nach 30 min weniger Fluoreszenz in das Endothel und Makrophagen der Leber aufgenommen. Die Bluthalbwertszeit von PEGylierten Partikeln schien damit deutlich länger zu sein, wie zu erwarten war.



PMAcOD-Qdots

CH₃-O-PEG-Qdots (10K)

NH₂-PEG-Qdots (10K)

Abbildung 4.21: Intravitalmikroskopie über der Leber in Mäusen nach intravenöser Injektion von PEGylierten SPIOs.

5. Diskussion und Ausblick

Im Bereich Charakterisierung von Nanopartikeln im Hinblick auf eine Anwendung in der Nanomedizin wurden in der Literatur bereits viele experimentelle Techniken verwendet, um die Bindung von Proteinen an Nanopartikel zu untersuchen. Aus den ermittelten Daten wurden einige Modelle vorgeschlagen, um den Austausch von Coronaproteinen zu erklären (Walkey und Chan 2012). Allerdings werden die Mechanismen der Protein-Corona-Bildung heute noch kontrovers diskutiert und kein vorhandenes Modell kann es vollständig erklären (Docter et al. 2014, Vroman 1962, Angioletti-Uberti et al. 2018).

Die am meisten akzeptierte Sicht auf die Protein-Corona-Bildung ist, dass Proteine, die anfangs in hoher Konzentration vorliegen, zuerst die Nanopartikeloberfläche bedecken. Proteine mit einer hohen Mobilität werden aber schnell gegen welche mit hoher Affinität ausgetauscht und es bildet sich dann die sogenannte stabile "harte" Protein-Korona. Die "weiche" Corona wird durch Proteine gebildet, die mit geringer Affinität adsorbieren und nur lose gebunden sind, z.B. auch in einer 2. und X-ten Schicht um die Hardcorona. Die Proteinadsorption ist dabei eine kinetische (k) und thermodynamische (K) -Funktion sowohl der einzelnen Proteine als auch der NP-Eigenschaften wie Oberflächeneigenschaften, Form und Durchmesser (Abb. 5.1).

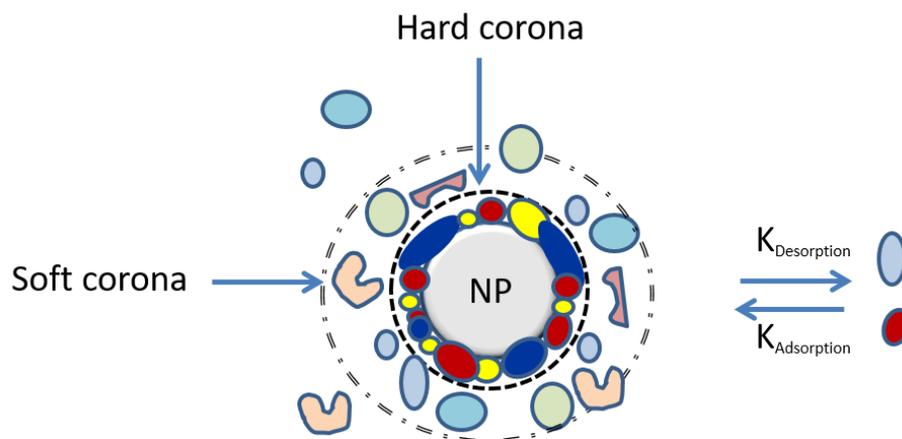


Abbildung 5.1: Modellbetrachtung einer Hard- und Softcorona. Durch den primären Kontakt mit Plasmaproteinen wird die Partikeloberfläche mit adsorbierten Proteinen belegt. Diese Schicht wird als **Hardcorona** bezeichnet, deren Proteine nur relativ schwer austauschbar sind z.B. gegen höher-affine Proteine. Die **Softcorona** bildet sich als 2- bzw. 3-xtte Schicht darüber, wobei deren Bindung an das Partikel insgesamt geringer ist und es dadurch leicht zu einem Austausch kommen kann.

Bei der Wanderung durch biologische Medien z.B. Blut *in vivo* findet offenbar ein permanenter Austausch zwischen den Partikeln und Proteinen statt (Walkey und Chan 2012, Vroman 1962). Bei den ca. 10.000 Proteinen im menschlichen Plasma haben nur wenige Proteine eine hohe Konzentration (zusammen 90 %: Albumin, IgG, Fibrinogen, Apolipoproteine und Komplementfaktoren). Beim Vergleich verschiedener NPs im Blutplasma wurde experimentell gezeigt, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines gegebenen Nanopartikels auch ihr individuelles "Ad-Sorbom" bestimmen (Walkey und Chan 2012).

Verschiedene Messprinzipien können ausgenutzt werden, um die Bindung von Proteinen an Nanopartikel quantitativ zu charakterisieren (Tabelle 5.1)

In der vorliegenden Arbeit wurden polymerbeschichtete monodisperse SPIOs (11 nm Kern, hydrodynamischer Durchmesser ca. 25 nm) sowie PEGylierte Varianten als Modell-Nanopartikel verwendet, die mit den ¹²⁵I-markierten Testproteinen Transferrin oder Albumin inkubiert wurden. Dadurch konnte der Austausch von Coronaproteinen *in vitro* verfolgt werden. Wie eine kürzlich durchgeführten Metaanalyse von adsorbierten Corona-Proteinen mit 63 verschiedenen Nanopartikeln in 26 Studien gezeigt hat, gehörten auch unsere ausgewählten Testproteine (Albumin, Transferrin) zu einer Gruppe von adsorbierten Plasma-Proteinen, die eine häufige Präsenz (> 10%) in den sich bildenden Coronen von vielen NPs aufweisen (Walkey und Chan 2012).

Analytische Technik	Messprinzip/Beschreibung	Ref
Isothermal Titration Calorimetrie (ITC)	Änderungen im Fluoreszenzspektrum	Lindman 2007, Baier 2011
Differentielle Centrifugations-Sedimentation (DCS)	Größenverteilung der NP	Monopoli 2011
Quarzkristall-Mikrowaagen (QCM)	Massenänderung auf oszillierender Quarzoberfläche	Brewer 2005
Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	Änderungen des Brechungsindex in einer Schicht auf Metalloberflächen	Patra 2016, Drum 2016
Rasterkraftmikroskopie	Abbildung von NP-Oberflächen	Dror 2017

Tabelle 5.2: Messmethoden zur Charakterisierung der Bindung von Proteinen an Nanopartikel.

Transferrin mit seiner gut verstandenen Funktion im Eisentransport wurde bereits mehrmals in Transferrin-konjugierten Nanopartikeln verwendet (Jiang 2010, Milani 2012, Salvati 2013). Die meisten bisher vorliegenden Ergebnisse der Zusammensetzung, der Struktur und der Bindungskinetik der Protein-Corona wurden bisher *ex situ* durchgeführt und erforderten die adäquate Isolierung der NPs aus einer künstlichen oder physiologischen Umgebung, beispielsweise durch Differentialzentrifugation (DSC) oder Größenausschluss-Chromatographie (SEC) (Monopoli et al. 2011, Thode et al. 1997). In der vorliegenden Studie verwendeten wir 100 kd Zentrifugationsfilter, um ungebundenes freies Protein aus dem Nanopartikel-Protein-Komplex zu entfernen. Es ist klar und ausführlich in der Literatur besprochen, dass dies, wie jede andere Trenntechnik, die Gefahr birgt, bereits lose gebundenes Protein aus dem Gleichgewicht zu entfernen (Mahmoudi et al. 2011). Die Absicht der hier beschriebenen Versuche konnte also weniger sein, möglichst präzise verbindliche Daten zu einem anderen SPIO-Beispiel der Literatur hinzuzufügen, sondern mehr eine Technik zu entwickeln, die es evtl. ermöglicht, den Einfluss einer vorgeformten Testkorona auch zukünftig *in vivo* Experimenten zu studieren.

In einem *in-vitro*-Experiment wurde zuerst die Gleichgewichtsbindung von ¹²⁵I-humanem Transferrin an polymerbeschichtete SPIOs mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 25 nm untersucht, die aufgrund von Carboxylgruppen negativ geladen sind. Wie erwartet, sank das Ausmaß der Transferrinbindung mit dem Grad der PEGylierung, in einigen stark PEGylierten Varianten (C40K und N10K) wurde kein Protein gebunden. Diese abstimmbare "postsynthetische" PEGylierung eines polymerbeschichteten SPIO könnte einen Weg aufzeigen, wie man ein NP für eine begrenzte Makrophagenaufnahme optimieren kann. PEGylierung wird eine wichtige Rolle bei Erfolg von nanobasierten Drug-delivery-Systemen zugeschrieben (Yadav und Dewangan 2021), um die Zirkulationsdauer im Blut zu verlängern. Die komplette Unterdrückung der Proteinadsorption kann aber nicht die richtige

Strategie sein, da dies auch die gewünschte spezifische Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor verringern würde (Röcker et al. 2009). Es wurde außerdem gezeigt, dass die wichtigen Plasmaproteine Transferrin und Albumin grundsätzlich an unser polymer-gecoatetes SPIOs sowie einiger PEGylierter Varianten binden können. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen von Röcker et al. (2009) und Jiang et al. (2010) unter Verwendung kleinerer (10 nm) FePt-Teilchen überein, die eine ähnliche Beschichtung hatten. Sie fanden durch Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie, dass beide Proteine an den Partikeln mit Affinitäten im mikromolaren Bereich adsorbieren (Transferrin 26 μM , Albumin. 5.1 μM).

Wenn unsere vorgeformte adsorbierte ^{125}I -Transferrin-Corona einem Überschuss an Albumin ausgesetzt war, wurde Transferrin aus den Partikeln entfernt und erscheint im FPLC-Peak des ungebundenen freien Proteins. Diese Feststellung eines sequentiellen Bindungsmusters verschiedener Plasmaproteine mit zunehmenden Bindungsaffinitäten würde den so genannten "Vroman-Effekt" unterstützen, der in vielen Experimenten an anderen Nanopartikeln, gemessen mit unterschiedlichen Methoden, schon vorher gefunden wurde. Andere Experimente in der Literatur zeigen aber mehr eine irreversible Bindung und die entsprechenden Autoren schlossen für ihre Bedingungen den „Vroman-Effekt“ aus (Jansch et al. 2012). Milani et al. fanden in Versuchen mit sulfonat- oder carboxymodifizierten Polystyrolatex-Kügelchen und fluoreszenzmarkiertem Transferrin, dass eine erste Transferrinschicht irreversibel an die Partikel gebunden wird, während eine sekundäre oder tertiäre Schicht mit anderen Proteinen oder Lipiden im steten Austausch stehen (Milani et al. 2012). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Größe der Partikel in Bezug auf die Proteingröße sein. In den meisten Studien wurden NPs mit einem Durchmesser > 40 nm verwendet, sodass dabei die Größe des Adsorbat (hier Transferrin mit 9 nm) viel kleiner als die des Adsorbenten (Nanopartikel) ist. Wenn Nanopartikel und Protein in der gleichen Größenordnung sind, scheint dagegen der Langmuir-Adsorptionsformalismus nicht zu gelten. Dies wurde z.B. von Liu et al. diskutiert, die Versuche mit CeO_2 -Partikel und Rinderserumalbumin mit ähnlicher Größe von 7 nm durchführten (Liu et al. 2013). Die kleinere freie Oberflächenenergie von Teilchen <10 nm wird mehr und mehr ausgeglichen durch

Scherkräfte aufgrund der Brownschen Bewegung, sodass es zu einer Ablösung von Proteinen kommen kann. Die Autoren erklärten ihren Befund mit einem Heteroaggregationsmodell, in dem eine kleine Anzahl von SPIOs zwischen den Proteinschichten stabilisiert wird. In unserer FPLC-Studie sehen wir dagegen keine SPIO-Aggregate bei unserem mit 11 nm etwas größeren SPIOs. Im Gegensatz zu unseren Erkenntnissen, fanden Jansch et al. in Versuchen mit kleineren USPIOs und Plasmaproteinen kein Albumin in der Korona und schlossen dabei einen "Vroman Effekt" für ihr Partikel aus (Jansch et al. 2012).

Es sieht deshalb zusammenfassend bisher so aus, dass die Formierung einer Proteincorona für ein bestimmtes Nanopartikel von deren individuellen Eigenschaften abhängt und nicht einfach vorhersehbar ist.

Als Ausblick kann hier geschlussfolgert werden, dass die Radiomarkierung von Proteinen in einer präformierten Proteincorona von Nanopartikeln auch für zukünftige *in-vivo*-Versuche interessant sein könnte. Damit könnte man untersuchen, ob und wie solche Proteine in Zellen/Organen aufgenommen werden.

6. Zusammenfassung/Summary

Es wurde eine Reihe von monodispersen superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (SPIOs) mit unterschiedlichen Kerngrößen mit einem Polymer verpackt und damit wasserlöslich gemacht. Da das dabei verwendete Polymaleinsäure-Octadecen-Polymer freie Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Partikel entwickelt, kann es in weiteren, schonenden Reaktionen in der Gegenwart vom Koppelungsreagenz EDC mit primären Aminen, inkl. Proteinen, reagieren. Mit Fluoreszeinamin wurde gezeigt, dass eine kovalente Bindung an ein polymerverpacktes SPIOs grundsätzlich möglich ist und die Fluoreszenz trotz der Nähe zum 11 nm Eisenoxidkern, mit seiner potentiell quencheden Wirkung, erhalten bleibt.

Für die Hauptversuche wurden mono-(CH₃-O-PEG-NH₂) oder bifunktionelle (NH₂PEG-NH₂) Polyethylenglykole (PEGs) verwendet, mit denen der PEGylierungsgrad der polymerverpackten SPIOs kontrolliert eingestellt werden konnte. In *in-vitro*-Versuchen wurde unter Verwendung der ¹²⁵I markierten Proteine Transferrin und Albumin die Proteincoronabildung an PEGylierten-SPIOs quantitativ untersucht. In Inkubationsansätzen wurde Nanopartikel-gebundenes Protein von freiem Protein mit Ultrafiltration getrennt. Anschließend wurden in FPLC-Chromatogrammen geeignete Fraktionen aufgefangen und auf ¹²⁵I- bzw. ⁵⁹Fe-Aktivität analysiert.

Die Bindung von ¹²⁵I-Transferrin an das Standard SPIOs (11 nm core-Größe) nimmt mit zunehmendem PEGylierungsgrad ab. Dabei haftet das adsorbierte Transferrin unter den experimentellen Trennbedingungen genau so fest an den Partikeln wie kovalent gebundenes Transferrin. Nach Inkubation mit einem 3-fachen Überschuss an bovinem Albumin wurde aber nur das adsorbierte, nicht das kovalent gebundene Transferrin von der Partikeloberfläche verdrängt. In einem weiteren Versuch wurde zuerst „kaltes“ Transferrin an die Partikel gebunden und dann ¹²⁵I-markiertes Albumin zugegeben. Wiederum wurde nur das adsorbierte Transferrin verdrängt. Das in der Corona verbleibende Transferrin war dabei funktionell und konnte zugesetztes ⁵⁹Fe aus ⁵⁹Fe-NTA binden. Diese Befunde, die eine Verdrängung eines primär gebundenen Proteins durch ein anderes an einer Nanopar-

tikeloberfläche zeigen, unterstützen die Theorie des sogenannten „Vroman-Effektes“, die in der Literatur das Austauschverhalten von Proteinen in einer Nanopartikel-Corona beschreibt. Die Alternative einer „Hardcorona“, die sich nach Erstkontakt mit einem Protein bildet und dann später trotz Kontakt mit anderen Proteinen weiter stabil bleibt, scheint für das hier untersuchte SPIOs (Kerngröße 11 nm) weniger zutreffend zu sein. Möglicherweise hängt dieses Verhalten aber individuell sehr von Nanopartikeleigenschaften ab (vor allem von Größen-/Oberflächenverhältnissen zwischen Nanopartikel und Protein) und es könnte im Einzelfall auch fließende Übergänge zwischen beiden Modellen geben.

Die hier durchgeführten Versuche mit zwei physiologisch relevanten radiomarkierten Plasmaproteinen sind auch methodisch interessant, besonders in Hinblick auf zukünftige *in-vivo* Untersuchungen, bei denen es um den Transport und das Schicksal von an Nanopartikel gebundenen Proteinen in Organe oder Gewebe geht.

Summary

A series of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) with different core sizes were coated with a polymer to make them water-soluble. Since the polymaleic acid-octadecene polymer used in this process develop free carboxyl groups, it can react in further gentle reactions with primary amines, including proteins, in the presence of the coupling reagent EDC. Using fluorescein amine, it was shown that a covalent binding to the polymer is possible, in which the fluorescence is retained despite the relative proximity to a fluorescence-quenching iron oxide core.

For the main experiments, mono-(CH₃-O-PEG-NH₂) or bifunctional (NH₂PEG-NH₂) polyethyleneglycols (PEGs) were used to PEGylate polymer-coated SPIOs, in which the degree of PEGylation could be modified systematically. Using ¹²⁵I-labeled transferrin and albumin as model proteins, the corona formation was quantitatively investigated by ultrafiltration to separate SPIOs-bound from free protein, followed by FPLC chromatography, and ¹²⁵I-counting in fractions.

The binding of ¹²⁵I-transferrin to our standard SPIOs (11 nm core size) decreased with increasing degree of PEGylation. Under the chromatography conditions,

adsorbed transferrin adheres just as firmly to the particles as covalently bound. However, after incubation with a 3-fold excess of bovine albumin, only the adsorbed but not the covalently bound transferrin was displaced from the particle surface. When “cold” transferrin was first bound to the particles and then ¹²⁵I-labeled albumin was added, only the adsorbed transferrin was displaced. The remaining transferrin in the corona was still functional and could bind ⁵⁹Fe from added ⁵⁹Fe-NTA. Fully PEGylated variants did not bind any protein.

These findings show the displacement of a primarily bound protein by another one at a nanoparticle corona supporting the theory of the so-called "Vroman effect".

An alternative model of a so-called "hard corona", which forms after initial contact with a protein and then later remains stable despite contact with other proteins, seems to be less applicable for the SPIOs investigated here. However, it is possible that this behavior depends individually very much on the nanoparticle properties (especially size/surface ratios between nanoparticle and protein) and there could also be smooth transitions between both models in individual cases.

The experiments performed here with two physiologically relevant radiolabeled plasma proteins could also be of interest from a methodological point of view, especially with regard to future *in-vivo* investigations that deal with the transport and fate of proteins bound to nanoparticles in organs or tissues.

Some of the results presented and discussed here have already been published (Bargheer, Nielsen et al. 2015).

7. Abkürzungsverzeichnis

AAS	AtomAbsorptionsSpektroskopie
Ak	Antikörper
Dcytb	Ferrireduktase Duodenal Cytochrom B
DLS	Dynamic Light Scattering
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	EthylenDiaminTetraAcetat
FDA	Food and Drug Administration
GKR	GanzKörperRetention
H	magnetische Feldstärke
HAMCO	Hamburger Ganzkörperzähler
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KZ	Kupffer Zellen
Mr	Remaneszenzmagnetisierung
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
OPR	OberflächenPlasmonenResonanz
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	PolyEthylenGlykol
PMAOD	Poly(MaleinsäureAnhydrid-alt-1-OctaDecen)
QD	QuantumDot
RES	ReticuloEndotheliales System
RT	RaumTemperatur
SBB	Sodium Borate Buffer (Natriumborat-Puffer)
SEC	Size-Exclusion-Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SPIO	SuperParamagnetic Iron Oxide nanoparticle (superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel)

T _{1/2}	Halbwertszeit
T1	longitudinale Relaxationszeit
T2	transversale Relaxationszeit
T2*	effektive transversale Relaxationszeit
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEM	TransmissionsElektronenMikroskop
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

8. Anhang (DLS Tabellen)

Tabelle 8.1: DLS-Messungen der verwendeten SPIOs

Z-Average: Partikeldurchmesser in nm; abgeleitet von den Intensitäts-Fluktuationen der gestreuten Strahlung

Pdl: Polydispersity Index: gibt den Grad der Polydispersität an: < 0,1 eher monodispers; > 0,5 eher polydispers; die Verwendung des Z-Average ist dann nicht sinnvoll

Peak: Im Histogramm stellt ein Peak eine weitere Partikelpopulation dar

Probe	Z-Average (d.nm)	Pdl	Peak 1 Mean Int.(d.nm)	Peak 1 Area Int(%)	Peak 2 Mean Int(d.nm)	Peak 2 Area Int(%)	Peak 3 Mean Int(d.nm)	Peak 3 Area Int(%)
PMacOD-SPIOs	89,91	0,540	82,27	1,7	19,32	98	5022	0,2
PMacOD-SPIOs	66,82	0,469	112,7	1,0	19,56	98,9	5285	0,1
PMacOD-SPIOs	65,30	0,533	101,0	1,2	20,15	98,6	5045	0,1
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	50,50	0,520	133,8	1,0	21,92	99,0	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	51,34	0,481	129,1	1,1	21,68	98,9	5072	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	53,93	0,459	22,32	99,9	4968	0,1	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	58,75	0,496	229,1	1,1	27,51	98,9	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	62,93	0,443	25,68	99,9	4762	0,1	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	59,62	0,513	130,2	1,6	23,65	98,4	5155	0,1
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	67,41	0,406	34,92	99,8	5208	0,2	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	64,96	0,395	30,56	99,8	4757	0,2	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	61,37	0,378	32,84	99,9	4789	0,1	0,000	0,0
Aminopeg+EDC(200X)	387,9	0,883	718,2	4,6	147,1	2,0	24,87	92,87
Aminopeg+EDC(200X)	231,8	0,670	403,4	2,8	26,77	61,6	5159	0,6
Aminopeg+EDC(200X)	294,1	0,716	605,4	3,8	104,2	2,7	23,61	93,2
Aminopeg+EDC(1KX)	317,8	0,641	271,3	1,4	34,85	98,6	0,000	0,0
Aminopeg+EDC(1KX)	195,4	0,425	33,95	98,7	276,9	1,3	0,000	0,0
Aminopeg+EDC(1KX)	131,0	0,506	33,39	98,4	411,1	1,5	5590	0,1
Aminopeg+EDC(10KX)	211,9	0,455	45,81	63,3	351,7	1,4	18,14	35,2
Aminopeg+EDC(10KX)	144,1	0,458	49,46	56,8	529,8	2,0	20,71	41,2
Aminopeg+EDC(10KX)	128,7	0,420	44,01	97,9	423,5	1,8	5548	0,3

Probe	Z-Average (d.nm)	Pdl	PK1 Mean Int (d.nm)	PK1 Area Int (%)	PK2 Mean Int (d.nm)	PK2 Area Int (%)	PK3 Mean Int (d.nm)	PK3 Area Int(%)
4nm- CAN ohne-Sono	205,5	0,200	205,2	100	0,00	0,00	0,00	0,00
4nm- CAN ohne Sono	202,6	0,196	202,6	97,7	5411	2,3	0,00	0,00
4nm CAN ohne Sono	202,9	0,169	215,0	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN ohne Sono	207,8	0,369	137,8	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN Ohne Sono	178,1	0,209	181,2	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN ohne Sono	175,5	0,220	194,8	100	0,00	0,00	0,00	0,00
11nm Weller ohne Sono	115,7	0,505	18,79	94,9	101,5	4,3	382,7	0,7
11nm Weller ohne Sono	117,7	0,504	206,5	3,1	22,72	96,9	0,00	0,00
11nm Weller ohne Sono	114,6	0,572	210,5	3,6	25,26	96,4	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	140,3	0,258	120,3	99,1	5201	0,90	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	139,6	0,258	129,3	27,1	26,78	72,9	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	139,4	0,235	138,1	27,5	28,29	72,5	0,00	0,00

Probe	Z-Average (d.nm)	Pdl	Peak 1 Mean Int.(d.nm)	Peak 1 Area Int(%)	Peak 2 Mean Int(d.nm)	Peak 2 Area Int(%)	Peak 3 Mean Int(d.nm)	Peak3 Area Int(%)
PMacOD-SPIOs	89.91	0.540	82.27	1.7	19,32	98	5022	0,2
PMacOD-SPIOs	66,82	0,469	112,7	1,0	19,56	98,9	5285	0,1
PMacOD-SPIOs	65,30	0,533	101,0	1,2	20,15	98,6	5045	0,1
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	50,50	0,520	133,8	1,0	21,92	99,0	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	51,34	0,481	129,1	1,1	21,68	98,9	5072	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(200x)	53,93	0,459	22,32	99,9	4968	0,1	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	58,75	0,496	229,1	1,1	27,51	98,9	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	62,93	0,443	25,68	99,9	4762	0,1	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(1000x)	59,62	0,513	130,2	1,6	23,65	98,4	5155	0,1
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	67,41	0,406	34,92	99,8	5208	0,2	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	64,96	0,395	30,56	99,8	4757	0,2	0,000	0,0
PMacOD-SPIOs+EDC(10000x)	61,37	0,378	32,84	99,9	4789	0,1	0,000	0,0

Probe	Z-Average (d.nm)	Pdl	Peak 1 Mean Int.(d.nm)	Peak 1 Area Int(%)	Peak 2 Mean Int(d.nm)	Peak 2 Area Int(%)	Peak 3 Mean Int(d.nm)	Peak3 Area Int(%)
PMacOD-SPIOs	89,91	0,540	19,32	98	82,27	1,7	5022	0,2
PMacOD+EDC(200x)	50,50	0,520	21,92	99,0	133,8	1,0	0,000	0,0
	51,34	0,481	21,68	98,9	129,1	1,1	5072	0,0
	53,93	0,459	22,32	99,9	4968	0,1	0,000	0,0
PMacO+EDC(1000x)	58,75	0,496	27,51	98,9	229,1	1,1	0,000	0,0
	62,93	0,443	25,68	99,9	4762	0,1	0,000	0,0
	59,62	0,513	23,65	98,4	130,2	1,6	5155	0,1
PMacOE DC(10000x)	67,41	0,406	34,92	99,8	5208	0,2	0,000	0,0

Probe	Z-Average (d.nm)	Pdl	PK1 Mean Int (d.nm)	PK1 Area Int (%)	PK2 Mean Int (d.nm)	PK2 Area Int (%)	PK3 Mean Int (d.nm)	PK3 Area Int(%)
4nm- CAN ohne Sono	205,5	0,200	205,2	100	0,00	0,00	0,00	0,00
4nm- CAN ohne Sono	202,6	0,196	202,6	97,7	5411	2,3	0,00	0,00
4nm CAN ohne Sono	202,9	0,169	215,0	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN ohne Sono	207,8	0,369	137,8	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN Ohne Sono	178,1	0,209	181,2	100	0,00	0,00	0,00	0,00
10nm CAN ohne Sono	175,5	0,220	194,8	100	0,00	0,00	0,00	0,00
11nm Weller ohne Sono	115,7	0,505	18,79	94,9	101,5	4,3	382,7	0,7
11nm Weller ohne Sono	117,7	0,504	206,5	3,1	22,72	96,9	0,00	0,00
11nm Weller ohne Sono	114,6	0,572	210,5	3,6	25,26	96,4	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	140,3	0,258	120,3	99,1	5201	0,90	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	139,6	0,258	129,3	27,1	26,78	72,9	0,00	0,00
18nm CAN ohne Sono	139,4	0,235	138,1	27,5	28,29	72,5	0,00	0,00

9. Literatur

Abbott NJ, Rönnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nature Reviews Neuroscience* (2006), 7(1): 41–53.

Albanese A, Tang PS, Chan WC. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2012), 14:1-16.

Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters.* (2012), 7(1):144. Published online 2012 Feb 21. doi: 10.1186/1556-276X-7-144

Angioletti-Uberti S, Ballauff M, Dzubiella J. Competitive adsorption of multiple proteins to nanoparticles: the Vroman effect revisited. *Molecular Physics,* (2018) 116:21-22, 3154-3163.

Baier G, Costa C, Zeller A, Baumann D, Sayer C, Araujo PHH, Mailänder V, Musyanovych A, Landfester K. BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake *Macromol. Biosci.* (2011), 11: 628-638.

Baptista PV, McCusker MP, Carvalho A, Ferreira DA, Mohan NM, Martins M, Fernandes AR. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". *Front Microbiol.* (2018), 9:1441. Published online 2018 Jul 2. doi: 10.3389/fmicb.2018.01441

Bargheer D, Nielsen J, Gébel G, Heine M, Salmen SC, Stauber R, Weller H, Heeren J, Nielsen P. The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015 Jan 6;6:36-46.

Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev.* (2017) 46(14):4218-4244.

Bera D, Qian L, Tseng T-K, Holloway PH: Quantum dots and their multimodal applications: a review. *Materials* 2010, 3(4):2260–2345.

Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res.* (2016), 33(10):2373-2387.

Braunsfurth JS, Gabbe EE, Heinrich HC. Performance parameters of the Hamburg 4 π whole body radioactivity detector. *Physics in Medicine and Biology* (1977), 22:1-17.

Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir* (2005), 21:9303-9307.

Bruns OT, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Lauterwasser J, Nikolic MS, Mollwitz B, Merkel M, Bigall NC, Sapra S, Reimer R, Hohenberg H, Weller H, Eychmuller A, Adam G, Beisiegel U, Heeren J. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nat. Nanotechnol.* (2009), 4(3):193-201.

Cao Y. The Toxicity of Nanoparticles to Human Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol.* (2018), 1048:59-69.

Chertok B, Moffat BA, David AE, Yu F, Bergemann C, Ross BD, Yang VC. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* (2008), 29(4): 487-496.

Cardoso VF, Francesko A, Ribeiro C, Bañobre-López M, Martins P, Lanceros-Mendez S. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv Healthc Mater.* (2018), 7(5). doi: 10.1002/adhm.201700845.

De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science* (2013), 339(6119): 535-539.

de Lázaro I, Mooney DJ. Obstacles and opportunities in a forward vision for cancer nanomedicine. *Nat Mater.* 2021 Nov;20(11):1469-1479.

Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* (2008), 5:487-495.

Docter D, Distler U, Storck W, Kuharev J, Wünsch D, Hahlbrock A, Knauer SK, Tenzer S, Stauber RH. Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nat. Protoc.* (2014), 9: 2030–2044.

Dror Y, Sorkin R, Brand G, Boubriak O, Urban J, Klein J. The effect of the serum corona on interactions between a single nano-object and a living cell. *Sci Rep.* (2017), 7:45758. doi: 10.1038/srep45758.

Drum CL. Component-Specific Analysis of Plasma Protein Corona Formation on Gold Nanoparticles Using Multiplexed Surface Plasmon Resonance. *Small.* (2016), 12(9):1174-82.

Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae.* (2011), 3(2): 34–55.

Feliu N, Docter D, Heine M, Del Pino P, Ashraf S, Kolosnjaj-Tabi J, Macchiarini P, Nielsen P, Alloyeau D, Gazeau F, Stauber RH, Parak WJ. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem Soc Rev.* (2016), 3;45(9):2440-57.

Feynman RP “There's plenty of room at the bottom” *Engineering and Science*, 23 (1960) 22-36.

Ferrucci JT, Stark, D. D. Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years. *AJR Am. J. Roentgenol.* (1990), 155(5): 943-950.

Freund B, Tromsdorf UI, Bruns OT, Heine M, Giemsa A, Bartelt A, Salmen SC, 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.* (2012), 6(8):7318-7325.

Frey A, Ramaker K, Röckendorf N, Wollenberg B, Lautenschläger I, Gébel G, Giemsa A, Bargherr D, Heine M, Nielsen P. Chapter 12: Fate and translocation of (nano)particulate matter in the gastrointestinal tract. In Gehr P und Zellner H (eds) *Biological Responses to Nanoscale Particles.* Springer Nature Switzerland AG 2019.

Fond G, Macgregor A, Miot S. Nanopsychiatry--the potential role of nanotechnologies in the future of psychiatry: a systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol.* (2013) 23(9):1067-71.

García Vence M, Chantada-Vázquez MDP, Vázquez-Estévez S, Manuel Cameselle-Teijeiro J, Bravo SB, Núñez C. Potential clinical applications of the personalized, disease-specific protein corona on nanoparticles. *Clin Chim Acta.* 2020 Feb;501:102-111. doi: 10.1016/j.cca.2019.10.027. Epub 2019 Oct 31.

Gholami L, Tafaghodi M, Abbasi B, Daroudi M, Kazemi Oskuee R. Preparation of superparamagnetic iron oxide/doxorubicin loaded chitosan nanoparticles as a promising glioblastoma theranostic tool. *J Cell Physiol.* (2019), 234(2):1547-1559.

Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane, *Expert. Opin. Pharmacother.* (2006), 7:1041-1053.

Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* (2005), 26(18):3995-4021.

Hoang Thi TT, Pilkington EH, Nguyen DH, Lee JS, Park KD, Truong NP. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers (Basel).* 2020 Feb 2;12(2):298. doi: 10.3390/polym12020298.

Hyeon T, Lee SS, Park J, Chung Y, Na HB. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J Am Chem Soc.* 2001 Dec 26;123(51):12798-127801.

Jansch M, Stumpf P, Graf C, Rühl E, Müller RH. Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. *Int J Pharm.* (2012), 428(1-2):125-33. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.060.

Jiang X, Weise S, Hafner M, Röcker C, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J. R.*

Soc., Interface (2010), 7:S5-S13.

Juliano R. Nanomedicine- is the wave cresting? Nat Rev Drug Discov. (2013), 12(3): 171– 172.

Kanwal U, Irfan Bukhari N, Ovais M, Abass N, Hussain K, Raza A. Advances in nanodelivery systems for doxorubicin: an updated insight. J Drug Target. (2018), 26(4):296310.

Kaufman ED, Belyea J, Johnson MC, Nicholson ZM, Ricks JL, Shah PK, Bayless M, Pettersson T, Feldotö Z, Blomberg E. Probing protein adsorption onto mercaptoundecanoic acid stabilized gold nanoparticles and surfaces by quartz crystal microbalance and zeta-potential measurements. Langmuir (2007), 23:6053-6062.

Karakoti AS, Das S, Thevuthasan S, Seal S. PEGylierte anorganische Nanopartikel. Angewandte Chemie 123.9 (2011), 2024-2040.

Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. Environ Health Perspect. 2011 Mar;119(3):a120-125.

Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. Biochim. Biophys. Acta (1991), 1062:142–148.

Lee DU, Kim DH, Choi DH, Kim SW, Lee HS, Yoo KH, Kim TW. Microstructural and optical properties of CdSe/CdS/ZnS core-shell-shell quantum dots. Opt Express. (2016), 24(2):A350-357.

Lindman S, Lynch I, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. Nano Lett (2007), (4):914-920.

Liu N, Tang M, Ding J. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. Chemosphere. 2020 Apr;245:125624. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125624. Epub 2019 Dec 12.

Li ZH, Peng J, Chen HL. Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for biomedical imaging. J Nanosci Nanotechnol. (2011), 11(9):7521-7536.

Li X, Iocozzia J, Chen Y, Zhao S, Cui X, Wang W, Yu H, Lin S, Lin Z. Functional Nanoparticles Enabled by Block Copolymer Templates: from Precision Synthesis of Block Copolymers to Properties and Applications of Nanoparticles. Angew Chem Int Ed Engl. (2018), 57(8):2046-2070.

Liu W, Rose J, Plantevin S, Auffan M, Bottero J.-Y, Vidaud C. Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? Nanoscale (2013),

5:1658-1668.

Liu J, Wei T, Zhao J, Huang Y, Deng H, Kumar A, Wang C, Liang Z, Ma X, Liang XJ. Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials*. (2016), 91:44-56.

Liu XL, Yang Y, Wu JP, Zhang YF, Fan HM, Ding J. Novel magnetic vortex nanorings/nanodiscs: Synthesis and theranostic applications. *Chinese Physics B*. (2015), 24(12):127505.

Lu A H, Salabas EL, Schuth, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed Engl*. (2007), 46(8):1222-1244.

Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions *Nano today* (2008), 3: 40-47.

Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev*. (2011), 14;111(9):5610-5637.

Milani S, Bombelli FB, Pitek AS, Dawson KA, Rädler J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: Soft and hard corona. *ACS Nano* (2012), 27: 2532-2541.

Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc*. (2011), 133,2525-2534.

Nanomedicine Market Analysis By Products, (Therapeutics, Regenerative Medicine, Diagnostics), By Application, (Clinical Oncology, Infectious diseases), By Nanomolecule (Gold, Silver, Iron Oxide, Alumina), & Segment Forecasts, 2018 – 2025 Report ID: 9781-68038-942-5 <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanomedicinemarket> Nano-Technologien.com <http://www.nano-technologien.com/anwendungen> [Stand 16.09.2019, 9:56]

Nair M, Jayant RD, Kaushik A, Sagar V. Getting into the brain: Potential of nanotechnology in the management of NeuroAIDS. *Adv Drug Deliv Rev*. (2016) 103:202-217.

Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater*. (2009), 8:543-557.

Palekar RU, Jallouk AP, Lanza GM, Pan H, Wickline SA. Molecular imaging of atherosclerosis with nanoparticle-based fluorinated MRI contrast agents. *Nanomedicine (London, England)*. (2015);10(11):1817-1832.

Pandey PK, Sharma AK, Gupta U. Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking. *Tissue Barriers* (2015),

15;4(1):e1129476.

Pardridge WM. Molecular Trojan horses for blood brain barrier drug delivery. *Discov Med* (2006), 6:139-143.

Patra A, Ding T, Engudar G, Wang Y, Dykas MM, Liedberg B, Kah JC, Venkatesan T, Drum CL. Component-Specific Analysis of Plasma Protein Corona Formation on Gold Nanoparticles Using Multiplexed Surface Plasmon Resonance. *Small*. 2016 Mar 2;12(9):1174-1182.

Pellegrino T, Manna L, Kudera S, Liedl T, Koktysh D, Rogach AL, Keller S, Rädler J, Natile G, Parak WJ. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.* (2004), 4(4): 703–707.

Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* (2015), 93:52-79.

Pietersz GA, Wang X, Yap ML, Lim B, Peter K. Therapeutic targeting in nanomedicine: the future lies in recombinant antibodies. *Nanomedicine (Lond).* (2017) 15:1873-1889.

Piotr B, Mariusz S, Jacek R. Methoxy Polyethylene Glycol-Epoetin Beta as a Novel Erythropoiesis Stimulating Agent with Possible Nephroprotective and Cardiovascular Protective Effects in Non-Dialysis Chronic Kidney Disease Patients. *Curr Pharm Biotechnol.* (2017);18(4):303-308.

Pisanic TR 2nd, Zhang Y, Wang TH. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst.* (2014), 139(12):2968-2981.

Rivera Gil P, Oberdörster G, Elder A, Puentes V, Parak WJ. Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *ACS Nano.* (2010), 4(10):5527-5531.

Rivera Gil P, Oberdörster G, Elder A, Puentes V, Parak WJ. Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *ACS Nano.* 2010 Oct 26;4(10):5527-5531

Röcker C, Plötzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* (2009), 4:577–580.

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.* (1983) 79:1086-1088.

Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Baldelli Bombelli F, Hristov DR, Kelly PM, Åberg C, Mahon E, Dawson KA. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotech.* (2013), 8:137-143.

Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release*. (2016), 10;235:34-47.

Sharma VK, McDonald TJ, Sohn M, Anquandah GAK, Pettine M, Zboril R. Assessment of toxicity of selenium and cadmium selenium quantum dots: A review. *Chemosphere*. (2017), 188:403-413.

Shtykova EV, Huang X, Gao X, Dyke JC, Schmucker AL, Dragnea B, Remmes N, Baxter DV, Stein B, Konarev PV, Svergun DI, Bronstein LM. Hydrophilic Monodisperse Magnetic Nanoparticles Protected by an Amphiphilic Alternating Copolymer. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*. (2008) 112(43):16809-16817.

Spuch C, Saida O, Navarro C. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. (2012), 6(1):2-18.

Stainthorpe A, Greenhalgh J, Bagust A, Richardson M, Boland A, Beale S, Duarte R, Kotas E, Banks L, Palmer D. Paclitaxel as Albumin-Bound Nanoparticles with Gemcitabine for Untreated Metastatic Pancreatic Cancer: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *Pharmacoeconomics*. (2018) 36(10):1153-1163. doi: 10.1007/s40273-018-0646-1.

Stark DD, Weissleder R, Elizondo G, Hahn PF, Saini S, Todd LE, Wittenberg J, Ferrucci JT. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 1988, 168 (2), 297-301.

Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. (2014), 53(46):12320-12364.

Sun S, Zeng H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124:8204–8205.

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 SK, Stauber RH. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. (2013), 8(10):772-781.

Thode K, Lück M, Semmler W, Müller, RH, Kresse M. Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: sample preparation. *Pharm. Res*. (1997), 14: 905-910.

Tromsdorf UI, Bruns OT, Salmen SC, Beisiegel U, Weller H. A highly effective, nontoxic T1 MR contrast agent based on ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles, *Nano. Lett.*, 9 (2009) 4434-4440.

Uchiyama MK, Toma SH, Rodrigues SF, Shimada AL, Loiola RA, Cervantes Rodríguez HJ, Oliveira PV, Luz MS, Rabbani SR, Toma HE, Poliselli Farsky SH, Araki K. Ultrasmall cationic superparamagnetic iron oxide nanoparticles as nontoxic and efficient MRI

contrast agent and magnetic-targeting tool *Int J Nanomedicine*. (2015), 10: 4731–4746.

Vroman, L. Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids *Nature* (1962), 196:476-477.

Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* (2012) , 41:2780-2799.

Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More effective nanomedicines through particle design. *Small* (2011), 14:1919-1931 Wang Y-XJ. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. (2011), 1(1):35-40.

Weller H. Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* (2003) 32:41-53.

Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* (2001), 4:362-372.

Wu K, Su D, Liu J, Saha R, Wang JP. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology*. 2019 Dec 13;30(50):502003.

Xie W, Guo Z, Gao F, Gao Q, Wang D, Liaw BS, Cai Q, Sun X, Wang X, Zhao L. Shape, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. *Theranostics*. (2018), 11;8(12):3284-3307.

Yadav D, Dewangan HK. PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021 Feb;32(2):266-280. doi: 10.1080/09205063.2020.1825304. Epub 2020 Sep 27.

Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun.* (2004), 20:2306–2307.

Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches *Int J Mol Sci.* (2016), 17(9): 1534. Published online 2016 Sep 13. doi: 10.3390/ijms17091534

Zhu L, Zhou Z, Mao H, Yang L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)*. (2017), 12(1):73-87.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Jörg Heeren für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die fortwährende und umfassende Betreuung am IBMZ.

Für die praktische und alltägliche Anleitung und Begleitung der Versuche gilt mein Dank insbesondere Dr. Denise Bargheer und Dr. Markus Heine, Dr. Klaus Tödter , sowie Dr. Roland Fischer.

Allen Technischen Mitarbeitern, namentlich insbesondere Sandra Ehret, Birgit Henkel, Walter Tauscher und Rosemarie Kongi, vielen Dank für die unermüdliche und immer geduldige Hilfe in größeren und kleineren Belangen und für die angenehme und freundliche Atmosphäre.

Meiner Familie, meinen Eltern Maria und Peter, meiner Freundin Julie, gilt unermesslicher Dank, Bewunderung und Anerkennung, wie ich sie in Worten kaum zum Ausdruck bringen kann.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: